

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PCF

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA: APLICAÇÕES NA
BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUITINA DA INDÚSTRIA PESQUEIRA**

PAULA MARIA CARNEIRO ROCHA

CASCAVEL-PR
2024

PAULA MARIA CARNEIRO ROCHA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA: APLICAÇÕES NA
BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUITINA DA INDÚSTRIA PESQUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão

CASCADEL

2024

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Carneiro Rocha, Paula Maria
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA: APLICAÇÕES
NA BIODERGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUITINA DA INDÚSTRIA
PESQUEIRA / Paula Maria Carneiro Rocha; orientadora Rita de
Cássia Garcia Simão . -- Cascavel, 2024.
55 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2024.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas fúngicas. 3. resíduos
pesqueiros. 4. quitinases. I. Garcia Simão , Rita de Cássia ,
orient. II. Título.

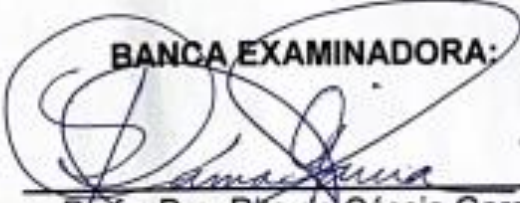
PAULA MARIA CARNEIRO ROCHA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA:
APLICAÇÕES NA BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUITINA DA
INDÚSTRIA PESQUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde

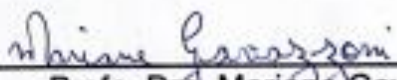
Orientador: Prof. Dr. Rita de Cássia Garcia Simão

BANCA EXAMINADORA:

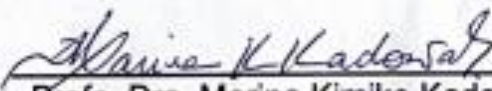


Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia
Simão

Universidade Estadual do Oeste do
Paraná UNIOESTE
Orientador



Profa. Dra. Mariane Gavazzoni
Secretaria Estadual de Educação do
Estado do Paraná SEED



Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná UNIOESTE

BIOGRAFIA RESUMIDA

Paula Maria Carneiro Rocha, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida em 03 de fevereiro de 1996, graduou-se em Biomedicina pela Universidade Paranaense – UNIPAR em 2019. Trabalhou como biomédica em laboratórios de Análises Clínicas e no banco de sangue do hospital Nossa Senhora da Salette em Cascavel. Em 2020 realizou pós-graduação *latu sensu* em Microbiologia pela Faculdade Unileya. No período de 2022 a 2024, realizou mestrado no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE *campus* Cascavel e desenvolveu projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pela professora Dra. Rita de Cassia Garcia Simão.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

À Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre colocar em meu caminho os desafios que me edificam e as pessoas que me amparam. Sinto seu amor e bondade em tudo na minha vida!

Aos meus pais, por todos os anos de amor incondicional e dedicação à minha formação, felicidade e prosperidade. Obrigada por sempre serem meu porto seguro. Obrigada por terem feito de mim a pessoa que sou hoje. Devo tudo a vocês.

Aos meus irmãos, Marcos e Pietra, por sempre estarem presentes nas etapas da minha vida, oferecendo apoio e carinho sempre que precisei. Obrigada por todas as piadas e zueiras nos momentos difíceis, vocês são muito importantes para mim.

Ao meu marido, Daniel Freire, que me acompanhou durante toda essa trajetória, vivendo cada emoção comigo como se fosse sua. Obrigada por sempre acreditar em mim e me fazer acreditar no meu potencial. Obrigada por todo apoio e companheirismo nas dificuldades, por sempre me fazer enxergar as pequenas vitórias e principalmente por acreditar no meu potencial e me lembrar disso todos os dias.

Aos meus sogros, Valmir e Neiva, por cuidarem de mim como filha, sempre zelando pelo meu bem-estar e oferecendo palavras de amor e carinho. Obrigada pelas conversas, risadas e também pelos domingos jogando pontinho e comendo suspiro.

Às minhas cunhadas do coração, Laura e Giulia por sempre estarem dispostos a ouvir sobre a minha pesquisa e por sempre oferecerem empatia quando eu estava desanimada. Obrigada pelas palavras motivacionais, pelo apoio emocional e pela prontidão em ajudar.

À minha orientadora, Dra. Rita de Cassia Garcia Simão, por todo o aprendizado compartilhado nesses anos de pesquisa. Sou grata pela oportunidade de ter aprendido com uma pesquisadora excepcional como você. Agradeço a paciência e dedicação no desenvolvimento da pesquisa e por sempre acreditar que tudo daria certo. Obrigada por me ajudar a ser uma melhor aluna e melhor pesquisadora.

À professora Marina Kimiko, pelos ensinamentos, risadas e cafezinhos. Obrigada pelo carinho e suporte emocional quando precisei, fazendo de tudo para me ajudar mesmo estando sobrecarregada com suas responsabilidades. Sempre me lembrarei de como me senti acolhida por você. Obrigada!

Aos professores Alexandre Maller e Zé Luís, pelos *insights* de suas mentes brilhantes, conselhos e direcionamentos quando necessário. Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar e por sempre oferecerem o melhor cafezinho da bioquímica.

Aos meus colegas de laboratório: Tatiane, Simone, Nickson, Walisson, Vitoria, Leticia, Lucas, Pedro, Maria e nossa queridíssima Elaine. Os dias de laboratório se tornavam mais leves e agradáveis quando divididos com vocês! Obrigada por partilharem a jornada de vocês comigo e por fazerem parte da minha. Obrigada pelo laço que criamos, vocês foram essenciais nessa jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE, por sempre zelarem pelo desenvolvimento pessoal e profissional de seus alunos.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA: APLICAÇÕES NA BIODERGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUITINA DA INDÚSTRIA PESQUEIRA

RESUMO

A quitina é um dos homopolissacarídeos mais abundantes na natureza, composto por unidades de N-acetil-glicosamina. Encontra-se presente em muitos organismos, principalmente em crustáceos, artrópodes e na parede celular de fungos e leveduras. É encontrada na natureza em três isoformas, α , β e γ e pode ser hidrolisada por quitinases (E.C 3.2.1.14), enzimas extracelulares produzidas por bactérias, fungos, vírus e plantas que quebram as ligações β -1,4 da estrutura da quitina. Estas enzimas são divididas em dois grandes grupos: endoquitinases e exoquitinases e apresentam aplicações em diversos setores biotecnológicos, como farmacêutico, alimentício, biomédico e no controle ambiental de pragas agrícolas como agentes inseticidas e bactericidas. A produção enzimática de quitinases por microrganismos oferece alternativas econômicas e eficientes aos processos industriais, possibilitando o desuso de agentes químicos convencionais. Neste sentido, este trabalho investigou a produção de quitinase extracelular pelo fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM, que até o momento ainda não havia sido descrita na literatura. O fungo foi cultivado em meio Czapeck líquido, suplementado com diferentes fontes de carbono a 28 °C sob condições de cultivo estacionárias por até 14 dias. A maior produção enzimática foi obtida no décimo dia de cultivo com escama de tilápia como fonte de carbono, apresentando 5,20 U mL⁻¹ nas condições iniciais de cultivo. O pH e temperatura ótimos de atividade enzimática da enzima quitinase foram de 4,5 e 55 °C respectivamente. Quando as condições ideais da enzima foram associadas, houve um aumento de 220% na atividade enzimática, chegando a 22,76 U mL⁻¹. O peso molecular da enzima foi estimado em 70kDa. A análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicaram que a degradação dos resíduos de quitina de casca de camarão e escama de tilápia *in natura* foram efetivos com 24 horas de tratamento enzimático, não sendo necessária a purificação da enzima para alteração da estrutura da quitina. Somados a isso, resultados obtidos a partir da análise dos produtos da hidrólise da casca do camarão *in natura* por cromatografia em camada delgada (CCD) indicaram que a quitinase de *C. echinulata* PA3S12MM se comporta como uma endoquitinase, com liberação de quito oligossacarídeos como quitotriose (GlcNAc)₃. Sendo assim, o fungo filamentoso *C. echinulata* PA3S12MM foi eficiente na produção de quitinase e na degradação de resíduos pesqueiros de casca de camarão e escama de tilápia, apresentando características bioquímicas satisfatórias para aplicações nos setores de gestão sustentável de resíduos industriais sem a necessidade de tratamentos químicos ácidos ou básicos onerosos ao meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: biotecnologia; enzimas fúngicas, resíduos pesqueiros; quitina.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL CHITINASES: APPLICATIONS IN THE BIODEGRADATION OF CHITIN WASTE FROM THE FISHING INDUSTRY

ABSTRACT

Chitin is one of the most abundant homopolysaccharides in nature, composed of N-acetyl-glucosamine units. It is present in many organisms, mainly in crustaceans, arthropods and in the cell walls of fungi and yeasts. It is found in nature in three isoforms, α , β and γ and can be hydrolyzed by chitinases (E.C 3.2.1.14), extracellular enzymes produced by bacteria, fungi, viruses and plants that break the β -1,4 bonds of the chitin structure. These enzymes are divided into two large groups: endochitinases and exochitinases and have applications in various biotechnological sectors, such as pharmaceutical, food, biomedical and in the environmental control of agricultural pests as insecticidal and bactericidal agents. The enzymatic production of chitinases by microorganisms offers economical and efficient alternatives to industrial processes, making it possible to disuse conventional chemical agents. Following this approach, this work investigated the production of extracellular chitinase by the fungus *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM, which until now had not been described in the literature. The fungus was grown in liquid Czapeck medium supplemented with different carbon sources at 28 °C under stationary culture conditions for up to 14 days. The highest enzyme production was obtained on the tenth day of cultivation with tilapia scales as a carbon source, presenting 5.20 U mL⁻¹ in the initial cultivation conditions. The optimum pH and temperature for enzymatic activity of the chitinase enzyme were 4.5 and 55 °C respectively. When ideal enzyme conditions were associated, there was a 220% increase in enzyme activity, reaching 22.76 U mL⁻¹. The molecular weight of the enzyme was estimated at 70kDa. Analysis of the images obtained by scanning electron microscopy (SEM) indicated that the degradation of chitin residues from shrimp shells and tilapia scales *in natura* was effective within 24 hours of enzymatic treatment, with no need to further purification of the enzyme to change the chitin structure. Also, results obtained from the analysis of the hydrolysis products of fresh shrimp shells by thin layer chromatography (TLC) indicated that the chitinase from *C. echinulata* PA3S12MM behaves like an endochitinase, with the release of chitooligosaccharides such as chitotriose (GlcNAc)₃. Therefore, the filamentous fungus *C. echinulata* PA3S12MM was efficient in the production of chitinase and in the degradation of fishing waste like shrimp shells and tilapia scales, presenting satisfactory biochemical characteristics for applications in the sectors of sustainable industrial waste management without the need for treatments like acidic or basic chemicals that are harmful to the environment.

KEYWORDS: biotechnology; chitin; fungal enzymes; seafood waste.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Quitina: origem e definição do polímero natural	16
1.2 Quitinases: propriedades enzimáticas e funções biológicas	18
1.3 Quitinases fúngicas: características bioquímicas.....	20
1.4 Aplicabilidade industrial das quitinases.....	24
1.4.1 Biocontrole de patógenos.....	25
1.4.2 Produção de Proteínas Unicelulares - Single Cell Protein (SCP).....	25
1.4.3 Produção de Quitooligosacarídeos (COS)	26
1.4.4 Farmacêutica e biomédica	26
1.4.5 Gerenciamento de resíduos	26
1.5 Fungo <i>Cunninghamella echinulata</i>	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
CAPÍTULO 1	29
3. CONCLUSÃO.....	53
4. REFERÊNCIAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	53

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Quitinases fúngicas: propriedades bioquímicas e fontes de carbono.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura das diferentes conformações da quitina (alfa, beta e gama).

Figura 2 Estrutura química da quitina, com evidência nos pontos de quebra da estrutura polimérica por ação das enzimas quitinolíticas.

Figura 3 Influência da fonte de carbono na produção enzimática extracelular de quitinase no fungo *C. echinulata* PA3S12MM. Os cultivos líquidos foram suplementados com 1% (p/v) de cada fonte de carbono e incubados por 7 dias a 28 °C de forma estacionária. As fontes de carbono são: pupa macerada 1% (1), quitosana 1% (2), casca de camarão 1% (3), casca de camarão 1%+ glicose 0,5% (4), glicose 1% (5), quitina coloidal 1% (6), quitina coloidal 0,5% + glicose 0,5% (7), casca de tomate 1% (8), casca de tomate 0,5% + farinha de linhaça 0,5% (9), farinha de linhaça 1% (10), casca de laranja 1% (11), pupa inteira 1% (12), escama de tilápia 1% (13) e cabeça de camarão sete barba 1% (14).

Figura 4 Influência do tempo de cultivo para a produção da enzima quitinase em *C. echinulata* PA3S12MM em cultivo submerso a 28°C, contendo escama de tilápia como fonte de carbono sob condições estacionárias.

Figura 5 Influência do pH (a), temperatura (b) na atividade enzimática de quitinase de *C. echinulata* PA3S12MM presente no extrato bruto filtrado, cultivada em meio líquido a 28 °C por 10 dias suplementada com escama de tilápia como fonte de carbono.

Figura 6 Análise por SDS-PAGE e zimograma da enzima quitinase de *C. echinulata* PA3S12MM. (kDa) Marcador de peso molecular, (1) extrato bruto de cultivo após ultrafiltração e corte molecular de 10kDa e (2) zimograma.

Figura 7 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da escama de tilápia e casca de camarão in natura tratadas com quitinases de *C. echinulata* presentes no extrato bruto (b) e (d) respectivamente. Controle: amostras de escama de tilápia e casca de camarão incubadas em tampão por 24 horas (a) e

(c), respectivamente. As amostras foram analisadas em aumento de 10.0 kx e resolução de 15 kV.

Figura 8 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos gerados a partir da hidrólise enzimática da casca de camarão in natura pela endoquitinase presente no extrato enzimático bruto após 24, 48, 72 e 96 horas. (P) padrão N-acetilglicosamina 1mg/mL.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quitina: origem e definição do polímero natural

Conhecida como um dos polímeros mais abundantes na natureza, a quitina é um homopolissacarídeo acetilado composto por unidades de N-acetil-glicosamina ligadas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, apresentada por um arranjo de microfibras estabilizadas por ligações de hidrogênio, formando uma estrutura ordenada e cristalina encontradas na natureza em três diferentes formas: α , β e γ quitina (Figura 1), que diferem, predominantemente, na orientação das fibras e polaridade das cadeias adjacentes, exibindo diferentes perfis em tecidos e funções fisiológicas dos seres vivos que apresentam esse material em sua estrutura (PATEL; GOYAL, 2017; PORIA et al., 2021).

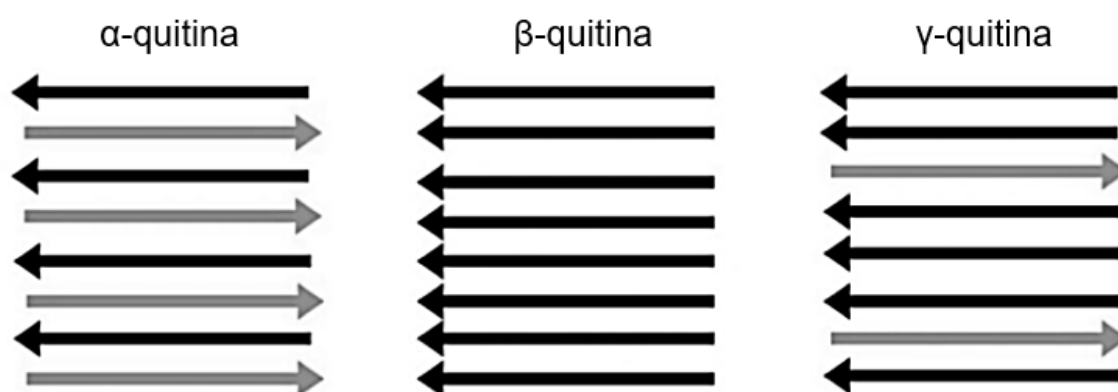


Figura 1 Estrutura das diferentes conformações da quitina (alfa, beta e gama). Fonte: adaptado de (PAKIZEH; MORADI; GHASSEMI 2021).

Encontrada majoritariamente em crustáceos, artrópodes e nas paredes celulares de fungos e leveduras, a forma mais comum, estável e mais abundante da quitina é a α -quitina, que apresenta fibras compactadas, com cadeias arranjadas de forma adjacentes e antiparalelas que conferem alta resistência e estabilidade a sua estrutura (MINKE; BLACKWELL, 1978; STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015).

A presença da α -quitina na estrutura destes organismos pode se apresentar de várias formas. Nos crustáceos e artrópodes, sua presença compõe cerca de 20 a 50% da cutícula que forma o exoesqueleto, configurando uma resistência mecânica contra predadores e microrganismos, e na adesão as mais variadas superfícies, sendo as microfibras de quitina as responsáveis pela sustentação do peso do animal. Nos fungos, é fundamental nos processos de manutenção da célula, na formação do anel

mitótico, no crescimento das hifas e também na composição de sua biomassa, constituindo cerca de 10 a 20% do volume da parede celular de fungos filamentosos (BAI et al., 2022; BROWN; ESHER; ALSPAUGH, 2020; MOUSSIAN, 2019; RONCERO; VÁZQUEZ DE ALDANA, 2020).

A β -quitina é encontrada apenas na parede celular de diatomáceas e em estruturas ósseas de animais da classe Cephalopoda, principalmente compondo o bico de lulas, onde neste caso, interage com proteínas específicas matriciais formando camadas alinhadas em regiões específicas do bico. β -quitina apresenta uma estrutura mais flexível em relação as estruturas alomórficas α e γ , apresentando cadeias adjacentes em forma de folhas paralelas, estabilizadas apenas por ligações de hidrogênio intramoleculares (BROWN; ESHER; ALSPAUGH, 2020; KAYA et al., 2017; MESSERLI et al., 2019; MOUSSIAN, 2019).

Quanto a γ -quitina, é considerada a forma alomórfica mais rara e menos estudada quanto a sua distribuição natural e estrutura. É geralmente considerada uma junção entre as estruturas α e β , onde a cada três cadeias paralelas, apresenta duas outras com sentido oposto. Por apresentar cadeias paralelas e antiparalelas, γ -quitinas apresentam a maior estabilidade dentre as três estruturas, pois possuem dois tipos de ligações de hidrogênio que estabilizam sua estrutura em duas direções, uma dentro da folha de fibras de quitina (intrafolha, entre o grupo carbonila da amida I e a amida II) e entre folhas (interfolha, entre a cadeia lateral CH_2OH e o grupo carbonila) (KAYA et al., 2017; MOUSSIAN, 2019; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Devido a sua estrutura apresentar muitas ligações de hidrogênio, tanto intra como intermolecular associadas a matriz proteica e mineralização, marcadas pela presença de carbonato de cálcio, a quitina apresenta-se como um polissacarídeo altamente hidrofóbico e insolúvel em água, porém é solúvel em alguns solventes inorgânicos (BAI et al., 2022; UNUOFIN et al., 2024).

A transformação da quitina em produtos solúveis abre um leque de possibilidades para aplicações de importância econômica. Aliando sua alta biodisponibilidade à suas características intrínsecas de baixa densidade, alta resistência, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, a quitina se torna ideal para otimização de recursos e processos em várias áreas. Em setores agroindustriais, auxilia no controle e biorremediação de solo e plantas por ação antibactericida, antifúngica e antioxidante. Nas indústrias alimentícias, ajuda na qualidade e no aumento de tempo de prateleira ou *shelf-life*. Na indústria têxtil e

farmacêutica, onde diferentemente de outras formas de biomassa, como a celulose, apresenta nitrogênio em sua estrutura, elemento crucial para processos dessas indústrias, presentes principalmente na forma de filmes, fibras, hidrogéis reticulados que atuam na dispersão de medicamentos e na reparação de tecidos (BAI et al., 2022; HOU; AYDEMIR; DUMANLI, 2021; KOBAYASHI; SAGAWA; FUKUOKA, 2023; NING YAN; XI CHEN, 2015; PORIA et al., 2021; SHAMSHINA; BERTON; ROGERS, 2019).

Ainda que muito importante, sua produção e descarte não são devidamente regulamentados e otimizados resultando em um grande acúmulo de resíduos, principalmente em processos que envolvem indústrias de frutos do mar. Estima-se que, anualmente, sejam produzidas de 8 a 10 toneladas de resíduos com altas quantidades de quitina, como casca de camarão e caranguejo e que mais de 60% deste volume seja descartado de maneira irregular no ambiente. Muitas vezes enterrados, incinerados ou mesmo empilhados em locais costeiros, causam odor e propiciam a contaminação de solo e água por microrganismos decompositores (AMIRI et al., 2022; HOU; AYDEMIR; DUMANLI, 2021; UNUOFIN et al., 2024).

Deste modo, é de grande importância econômica o desenvolvimento de pesquisas que estudem a degradação da quitina com uso de enzimas microbianas que realizam biocatálise em condições mais brandas quando comparadas a catalisadores químicos, além de serem mais ecológicas, de baixo custo e com produtos finais de maior valor, pureza e estabilidade. Neste contexto, o gerenciamento destes resíduos oferece uma solução para o problema ambiental de descarte de resíduos de quitina oferecendo geração simultânea de produtos de valor agregado.

1.2 Quitinases: propriedades enzimáticas e funções biológicas

As quitinases (E.C 3.2.1.14) são enzimas que hidrolisam as ligações β -1 $\rightarrow$ 4 da quitina gerando quitoooligômeros de menor peso molecular. De um modo geral, são divididas em dois grandes grupos: endoquitinases (E.C 3.2.1.14) e exoquitinases (Figura 2). Ambas pertencem à família das glicosil hidrolases (GH), mais especificamente entre os grupos GH 18, 19, 20 e 48, classificadas de acordo com seu sítio de ação, produto, sequência de amino ácidos e sequência genica (HAMID et al., 2013; PORIA et al., 2021; SHARMA et al., 2020).

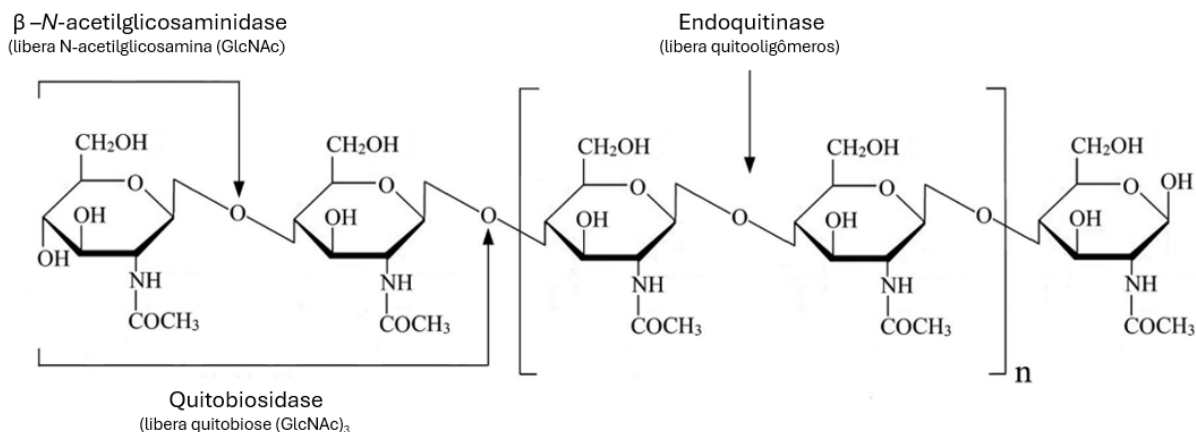


Figura 2 Estrutura química da quitina, com evidência nos pontos de quebra da estrutura polimérica por ação das enzimas quitinolíticas. Fonte: adaptado de (STOYKOV et al., 2015).

Endoquitinases hidrolisam aleatoriamente as ligações internas da estrutura da quitina, liberando quitooligosacarídeos de vários tamanhos, como dímeros e multímeros de baixo peso molecular como quitotriose e quitotetraose. Já as exoquitinases são divididas em duas subcategorias: as quitobiosidases (E.C 3.2.1.29), que atuam na extremidade não redutora da estrutura da quitina, liberando progressivamente dicetilquitobiose e as 1-4-β-glucosaminídes (E.C 3.2.1.30), que quebram os oligômeros liberados por endoquitinases e quitobiasas, gerando monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) (DRAVID et al., 2015; HAMID et al., 2013; UNUOFIN et al., 2024).

A produção de quitinases é bem distribuída em todos os ecossistemas, presentes em insetos, vírus, fungos, bactérias e plantas. Apresentam diferenças quanto ao peso molecular (20 a 170 kDa), ponto isoelétrico (pI), pH ótimo (3 a 10), temperatura ótima (25 a 75 °C) e especificidade ao substrato. A depender de sua fonte e classificação, quitinases apresentam diferentes funções biológicas (THAKUR et al., 2023; UNUOFIN et al., 2024).

Quitinases do grupo GH 18 são as mais abundantes encontradas em insetos, vírus, fungos e bactérias. Nos insetos, auxiliam na transformação de larvas em adultos, especialmente na remoção dos exoesqueletos antigos. Nos vírus, atuam no enfraquecimento da barreira natural do hospedeiro, facilitando a infecção viral e a liberação de novos vírus (BERINI et al., 2018).

Em fungos e bactérias, são subdivididas em A, B e C, de acordo com sua similaridade de sequência, arquitetura do sítio de ligação ao substrato e atividade enzimática endo ou exoquitinases) (CHEN; YANG, 2020). Nos fungos desempenham

funções importantes como a modulação da parede celular durante a divisão celular, crescimento, morfogênese e micoparasitismo, solidificando a ideia de que todos os fungos possuem quitinases, mesmo que diferentes. Nas bactérias, atuam na degradação da quitina no solo e em ambientes marinhos, desempenhando um papel importante na reciclagem do ambiente marinho (GOUGHENOUR et al., 2021; PORIA et al., 2021).

No grupo GH 19, encontram-se as quitinases produzidas por plantas, atuando majoritariamente na resposta contra patógenos e ao estresse ambiental. As GH 20 por sua vez, são representadas por algumas quitinases humanas e bactérias como actinomicetes e bactérias purpuras, porém sem estudos detalhados quanto a sua estrutura e função (PORIA et al., 2021; VAGHELA et al., 2022).

1.3 Quitinases fúngicas: características bioquímicas

O progresso nas áreas biotecnológicas criaram espaço para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o melhor aproveitamento das enzimas microbianas. Estas, apresentaram respostas para a otimização de processos industriais baseando-se no conhecimento de especificidade enzimática, eficiência e velocidade das reações metabólicas, favorecendo seu desenvolvimento superior quando comparada à processos químicos, com menor tempo de processamento, baixo consumo energético e reações atóxicas, consideradas mais ecológicas ou *eco-friendly* (BHADRA et al., 2022; MAHAJAN; SHARMA; GUPTA, 2024; SINGH et al., 2016; UNUOFIN et al., 2024).

Fungos desempenham um papel crucial na dinâmica dos sistemas ecológicos, responsáveis pela degradação da matéria orgânica e na ciclagem dos nutrientes. Também apresentam interações simbióticas de mutualismo e parasitismo com algas (líquens), plantas (micorrizas) e diversos outros organismos (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). Além disso, fungos apresentam uma grande diversidade de enzimas disponíveis para digestão celular, suas enzimas são secretadas em diversos substratos, quebrando macromoléculas em complexos menores e mais facilmente assimiláveis, possibilitando sua sobrevivência em diferentes condições ambientais (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

Dentre as enzimas fúngicas mais importantes empregadas no uso de processos industriais podemos citar amilases, celulasas, pectinases, cutinases, lipases, xilanases, lacases e quitinases (BHADRA et al., 2022). Quitinases fúngicas

são descritas em diferentes gêneros, incluindo *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Coprinopsis*, *Metarhizium*, *Pistacia* e *Lactarius* assumem. Podem assumir diversas funções, porém apenas em fungos e bactérias podem atuar como “quitinases verdadeiras”, excretadas com o único propósito de quebrar quitina para nutrição e sobrevivência (MAHAJAN; SHARMA; GUPTA, 2024; PORIA et al., 2021). A tabela 1 apresenta quitinases produzidas por fungos e suas principais características bioquímicas.

Tabela 1 Quitinases fúngicas: propriedades bioquímicas e fontes de carbono.

Fungo	Massa Molecular (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Tempo de Cultivo (dias)	Fonte de Carbono	Atividade Quitinolítica	Referência
<i>Alternaria alternate</i>		5	30	7	Quitina coloidal	5,48 ⁽²⁾	(SHARAF, 2005)
<i>Aspergillus flavus</i> AUMC 13576	30	7,5	60	7	Quitina Coloidal	620,54 ⁽⁴⁾	(BELTAGY et al., 2018)
<i>Aspergillus flavus</i> CFR 10	-	4,6	62	7	α -quitina	26,8 ⁽³⁾	(SURESH; ANIL KUMAR, 2012)
<i>Aspergillus fumigatus</i> YJ-407	46	5	64	4	Quitina	3,36 ⁽¹⁾	(XIA et al., 2001)
<i>Aspergillus niger</i>		4	28	7	Sacarose	4,42 ⁽⁵⁾	(KAUR; RAHI, 2024)
<i>Aspergillus niveus</i>	43,9	6	65	4	Casca de Camarão	44,3 ⁽¹⁾	(ORNELA; GUIMARÃES, 2024)
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	7	Casca de camarão em pó	4,89 ⁽¹⁾	(E.K.; M.K. NISHA; E. GAAYATHIRI DEVI, 2020)
<i>Aspergillus terreus</i>	60	5,6	50	5	Casca de camarão em pó	182,8 ⁽¹⁾	(FARAG et al., 2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	-	6	50	4	Escama de peixe	-	(GHANEM; AL-GARNI; AL-MAKISHAH, 2010)
<i>Aspergillus niger</i> LOCK 62	73	6	40	6	Quitina coloidal e casca de camarão	22,5 ⁽¹⁾	(BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012)
<i>Eremothecium ashbyii</i>	30	-	-	6	Quitina Coloidal	6,2 ⁽²⁾	(SIMADRI; SANDEEP; VIJAYALAKSHMI, 2020)
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	6,4	32	7	Pó de quitina	17,5 ⁽³⁾	(THADATHIL et al., 2014)
<i>Fusarium oxysporum</i> CFR 8	-	4,6	62	7	α -quitina	13,3 ⁽³⁾	(SURESH; ANIL KUMAR, 2012)
<i>P. janthinellum</i> P9 CHI1	45	5,5	55	-	Quitina coloidal e casca de camarão	44,28 ⁽¹⁾	(DI GIAMBATTISTA et al., 2001)
<i>P. janthinellum</i> P9 CHI2	35,4	4,5	50	-	Quitina coloidal e casca de camarão	54 ⁽¹⁾	(DI GIAMBATTISTA et al., 2001)
<i>Penicillium aculeatum</i> NRRL 2129 ATCC 10409	82	5,5	50	3	Quitina	3,71 ⁽¹⁾	(BINOD et al., 2005)
<i>Penicillium chrysogenum</i> MH745129	42	6	40	7	Casca de Camarão	78,2 ⁽²⁾	(ATALLA; EL GAMAL; AWAD, 2020)

<i>Penicillium monoverticillium</i>	-	4,6	52	7	α -quitina	41 ⁽³⁾	(SURESH; ANIL KUMAR, 2012)
<i>Penicillium oxalicum</i>	-	5	40		Pó de quitina	37 ⁽²⁾	(XIE et al., 2021)
<i>Rhizopus oryzae</i>	50	5,5	60	5	Amido	162,2 ⁽¹⁾	(CHEN; CHEN; JIANG, 2013)
<i>Rhizopus oryzae</i>	50	5,5	60	5	Quitina	165,2 ⁽¹⁾	(CHEN; CHEN; JIANG, 2013)
<i>Thermothelomyces heterothallicus</i> PA2S4T	-	4,5	50	10	Casca de laranja	82,3 ⁽²⁾	(POMMER et al., 2021)
<i>Thermothelomyces heterothallicus</i> PA2S4T	120	6	65	7	Casca de camarão	127,86 ⁽¹⁾	(HELFENSTEIN ROTHER et al., 2024)
<i>Trichoderma asperellum</i>	45	5	37	7	Quitina Coloidal	25.800 ⁽⁴⁾	(BERINI et al., 2024)
<i>Trichoderma asperellum</i> UTP-16	-	6	35	2,3	Amido	2,5 ⁽²⁾	(KUMAR et al., 2012)
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	4,5	30	4	Quitina Coloidal	2,46 ⁽³⁾	(NAMPOOTHIRI et al., 2004)
<i>Trichoderma harzianum</i> TUBF 966	-	5,5	30	4	Quitina Coloidal	14,7 ⁽²⁾	(SANDHYA et al., 2004)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	23,41	5,2	37	4	Quitina coloidal	5,64 ⁽²⁾	(ANWAR et al., 2023)
<i>Trichoderma virens</i>	-	4	30	6	Quitina Coloidal	0,14 ⁽²⁾	(WASLI et al., 2009)
<i>Trichoderma viride</i> AUMC 13021	62	6,5	40	4	Quitina Coloidal	38,33 ⁽¹⁾	(ABU-TAHON; ISAAC, 2020)

(1)U/mg; (2)U/mL; (3)U/g (substrato inicial seco); (4)U/L; (5) g/L

Como exposto na tabela 1, a expressão enzimática das quitinases, em sua maioria, é relacionada à presença de quitina no meio de cultivo, porém algumas exceções são relatadas, como no estudo de CHEN et al., 2013, onde vários polissacarídeos foram testados para determinação da especificidade do substrato da quitinase purificada de *Rhizopus oryzae*. Dentre os substratos selecionados, apenas quitina coloidal e amido foram hidrolisados, sugerindo que a quitinase presente pode exercer o papel de uma enzima bifuncional com atividade de quitinase e amilase.

Outra fonte alternativa para produção enzimática da quitinase relatada na literatura é a casca da laranja. Estas são geralmente utilizadas na produção de enzimas como pectinases, poligalacturonases e lacases, principalmente por apresentam altas concentrações de pectina (42.5%), açúcares (16.9%), hemicelulose (10.5%) e celulose (9.21%) (MRUDULA; ANITHARAJ, 2011). No entanto, no trabalho de Pomer et al., 2021, foi possível verificar que a melhor produção extracelular de quitinase pelo fungo *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T foi obtida através da suplementação do meio de cultivo com casca de laranja, obtendo 82,3 U/mL em cultivo líquido.

Além disso, escamas de peixe também se apresentam como fontes alternativas indutoras para produção enzimática de quitinases em fungos, como relatado em *Aspergillus terreus*, *Trichoderma harzianum*, e *Metarhizium verrucaria*, que tiveram a melhor produção enzimática de quitinases em meios de cultivo onde escamas de peixes foram usadas como fonte de carbono (GHANEM; AL-GARNI S; AL-MAKISHAH N, 2010).

1.4 Aplicabilidade industrial das quitinases

Os avanços biotecnológicos exploram a enzimologia, usando microrganismos para otimização dos processos industriais. Os bioprocessos se baseiam na seletividade, especificidade e eficiência das reações metabólicas, gerando produtos de valor agregado em condições menos dispendiosas, comparadas aos processos químicos atualmente empregados (MAHAJAN; SHARMA; GUPTA, 2024; UNUOFIN et al., 2024).

Quitinases são enzimas multifuncionais, que podem ser empregadas em diversos propósitos industriais. Atualmente, quitinases de *Aspergillus niger*, *Streptomyces griseus*, *Trichoderma viride*, *Clostridium thermocellum*, *Bacillus cereus*,

cillus licheniformis e *Clostridium thermocellum* já estão comercialmente disponíveis (PORIA et al., 2021).

Quitinases apresentam propriedades físico-químicas diferentes dependendo do microrganismo produtor, variando principalmente seu peso molecular, ponto isoelétrico, estabilidade térmica e faixa de pH, consideradas características fundamentais para a distribuição das quitinases nos setores industriais emergentes. (THAKUR et al., 2023; UNUOFIN et al., 2024).

1.4.1 Biocontrole de patógenos

Nas últimas décadas, o aumento populacional tem gerado uma crescente demanda na produção agrícola de insumos. Esta, por sua vez, fica mais dependente de fertilizantes e agrotóxicos para proteção da lavoura, porém, causando danos à qualidade dos alimentos e ao equilíbrio dos ecossistemas (THAKUR et al., 2023).

O controle biológico de pragas é uma alternativa ao uso de agentes químicos na agricultura. Quitinases apresentam propriedades antifúngicas eficientes na degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos (BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012; NAMPOOTHIRI et al., 2004), bem como ação inseticida e larvicida, onde quitinases de *Penicillium ochrochloron* e *Streptomyces mutabilis* foram eficientes no controle do estágio larval e pupal de *Helicoverpa armígera* e *Aedes Aegypti*, respectivamente (PATIL; JADHAV, 2015; RAJENDRAN et al., 2024).

1.4.2 Produção de Proteínas Unicelulares - Single Cell Protein (SCP)

Resíduos de quitina podem ser hidrolisados por quitinases para formação de seus quitoooligômeros. Estes, podem ser usados para o crescimento de organismos unicelulares para produção de proteínas unicelulares, que são destinadas à suplementação alimentar (SAINI et al., 2020).

Patil (2014), demonstrou que a quitinase de *Penicillium ochrochloron* consegue converter casca de mariscos em N-acetyl-D-glicosamina, usada como substrato para produção de SCP a partir de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3450 com aumento de 50% na produção de SCP quando comparada a outros substratos.

1.4.3 Produção de Quitoooligosacarídeos (COS)

Quitoooligosacarídeos são os produtos gerados pela despolimerização da quitina. Podem ser obtidos através de hidrólise ácida, alcalina, degradação oxidativa e também hidrólise enzimática (LI et al., 2016). Dentre as aplicações biológicas dos QOS, podemos citar sua ação antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, imunoestimulatória e na produção de alimentos probióticos (LIAQAT; ELTEM, 2018).

Rother et al. (2024) utilizaram quitinase de *T. heterothallicus* PA2S4T para produção de QOS a partir da degradação de cascas de camarão *in natura*, indicando que o produto da degradação dos resíduos de camarão apresenta baixo grau de polimerização. Os mesmos autores também verificaram o potencial probiótico da quitinase na produção de *Lactobacillus paracasei*.

1.4.4 Farmacêutica e biomédica

Quitinases são aplicadas em terapias de cicatrização de feridas e regeneração tecidual, atuando na quebra de quitina presente em curativos para otimizar a remoção dos tecidos necróticos (MADAN et al., 2020). Também podem ser empregadas no tratamento de câncer por meio de terapia dirigida para entrega de medicamentos (Targeting Drug Delivery), afetando diretamente o microambiente tumoral (MAHAJAN; SHARMA; GUPTA, 2024) e como coadjuvantes nos tratamentos antifúngicos pela lise da parede celular de microrganismos, inibindo seu crescimento ou aumentando a eficiência antifúngica do tratamento (UNUOFIN et al., 2024).

1.4.5 Gerenciamento de resíduos

Resíduos produzidos pelas indústrias pesqueiras compreendem as partes duras e não comestíveis dos frutos do mar. Cabeça e casca de camarão, caranguejo, siri, lagosta, assim como cabeça e escama de peixe são os principais dejetos produzidos por esse setor industrial. Anualmente, cerca de 6 a 8 milhões de toneladas desses resíduos são produzidos mundialmente (MAO et al., 2017), dos quais mais de 80% são descartados de forma inadequada em aterros, nos oceanos ou são incinerados (MATHEW et al., 2020).

A degradação da quitina mediada por enzimas biológicas é uma alternativa promissora e ecológica para o gerenciamento e biorremediação de ambientes

contaminados pelo despojamento excessivo e irregular destes resíduos (SAINI et al., 2020). Como demonstrado na Tabela 1, diversas enzimas fúngicas apresentam potencial para degradação dos materiais quitinolíticos. Por possuírem em sua estrutura cerca de 40-60% de quitina, esses resíduos apresentam um potencial para produção de oligômeros e monômeros de N-acetilglicosamina empregados em diversos setores biotecnológicos (HOU; AYDEMIR; DUMANLI, 2021).

1.5 Fungo *Cunninghamella echinulata*

Descrita inicialmente em 1891 como *Oedocephalum echinulatum* e renomeada em 1903 por Matruchot (ALCORN; YEAGER, 1938), *Cunninghamella echinulata* se encontra no filo Mucoromycota, classe Mucoromycetes, ordem Mucorales e família Cunninghamellaceae (NCBI Taxonomy).

Cunninghamella é composto por 14 espécies, diferenciadas com base em suas características morfológicas de cor e textura da colônia, ramificação, formato e tamanho da vesícula e a presença ou ausência de espinhos na superfície do esporângio. Podem ser encontradas no solo, em grãos ou em outros substratos orgânicos. Não apresentam patogenicidade à humanos, porém existem relatos de sinusite fúngica invasiva em pessoas imunocomprometidas (ALCORN; YEAGER, 1938; ALVES et al., 2017).

Cunninghamella echinulata tem sido amplamente explorada no setor biotecnológico para produção de enzimas com aplicações industriais, performando na produção de açúcar invertido (RASBOLD et al., 2021), bioconversão e transformação de fármacos (ZAWADZKA et al., 2017; ZHONG et al., 2003), biosorvente na remoção de metais pesados como chumbo, cobre e zinco (EI-MORSY, 2004) e na biorremediação de contaminação por petróleo (YEHIA, 2023).

Tendo em vista o passivo ambiental gerado pelos descartes pesqueiros, as diferentes potencialidades das quitinases, bem como a notável versatilidade do fungo *C. echinulata* em responder as condições ambientais, este trabalho buscou analisar o potencial da enzima quitinase, a partir do fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM, na hidrólise de materiais quitinolíticos de descarte pesqueiro, buscando uma alternativa sustentável para o gerenciamento e biorremediação de ambientes contaminados com o descarte inapropriado desses materiais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Este estudo teve como objetivo principal investigar a produção e caracterização bioquimicamente a quitinase extracelular de *C. echinulata* PA3S12MM, além de testar sua aplicabilidade na degradação de resíduos de quitina.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a melhor fonte de carbono indutora para produção de quitinase extracelular;
- Caracterizar bioquimicamente o melhor pH e temperatura da enzima;
- Verificar a capacidade da enzima em degradar escama de tilápia e casca de camarão *in natura*.

CAPÍTULO 1

Aplicações na Biodegradação de Resíduos de Quitina da Indústria Pesqueira por Quitinases de *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM.

Paula Maria Carneiro Rocha e Rita de Cassia Garcia Simão

Resumo

O crescente aumento do consumo de frutos do mar tem agravado o acúmulo de resíduos de descarte pesqueiro (cascas de camarão, cabeças e escamas de peixes) no ambiente, trazendo prejuízos à indústria na gestão destes resíduos e ao ambiente com destaque para os corpos hídricos. Estes resíduos possuem quitina em sua composição, um polissacarídeo linear insolúvel e biodegradável, que pode ser hidrolisado por ação enzimática. Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações β (1 $\rightarrow$ 4) de quitina, liberando quitoooligosacarídeos e N-acetilglicosamina, que apresentam aplicações em diversos setores industriais, como o farmacêutico, agrícola e alimentício. Este trabalho buscou investigar a produção extracelular de quitinase produzida por *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM e sua caracterização parcial para degradação de resíduos sólidos de quitina como escama de tilápia e casca de camarão. A maior produção enzimática foi obtida no décimo dia de cultivo com escama de tilápia como fonte de carbono, apresentando 5,20 U mL⁻¹ nas condições iniciais de cultivo. O pH e temperatura ótimos da enzima foram de 4,5 e 55 °C, respectivamente. Quando as condições ideais da enzima foram associadas, houve um aumento de 220% na atividade enzimática, chegando a 22,76 U mL⁻¹ e seu peso molecular estimado em 70 kDa por SDS-PAGE. A análise morfológica da escama de tilápia e casca de camarão *in natura* analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostram que a quitinase foi eficiente na degradação desses resíduos quitinolíticos sem a necessidade de tratamento químico ou físico. Somados a isso, resultados obtidos a partir dos produtos da hidrólise da casca do camarão *in natura* analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) indicam a presença de uma endoquitinase, com liberação de quitoooligosacarídeos como quitotriose e quitotetraoses. Este trabalho mostra pela primeira vez que a quitinase da cepa *C. echinulata* PA3S12MM foi eficiente na biodegradação de resíduos a base de quitina,

e apresenta uma alternativa sustentável e de baixo custo para o gerenciamento e biorremediação de ambientes contaminados com o descarte cumulativo de resíduos da indústria pesqueira.

Palavras-chave: quitina; gerenciamento de resíduos; biodegradação; biotecnologia.

1. Introdução

Considerada um dos polissacarídeos mais abundantes espalhados pela natureza, a quitina pode ser encontrada na parede celular de fungos e como componente estrutural de conchas e exoesqueletos de muitos organismos, como moluscos, crustáceos, algas e invertebrados marinhos (Patel and Goyal 2017; Bai et al. 2022). Composta por unidades de N-acetil-D-glucosamina ligadas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4), a quitina apresenta três isoformas (α , β e γ) diferenciadas, principalmente, pela orientação de suas fibras e pela polaridade das cadeias adjacentes (Poria et al. 2021).

A quitina é um homopolissacarídeo insolúvel e biodegradável, que pode ser hidrolisado por quitinases (EC 3.2.1.14) as quais pertencem a família das glicosil hidrolases (GH) e são responsáveis por clivar a ligação glicosídica β -1,4 entre as unidades de N-acetil-D-glicosamina da quitina, possibilitando a recuperação de quitoooligômeros e monômeros de importância para vários setores industriais (Adnan et al. 2024; Ornela and Guimarães 2024).

Quitinases estão presentes em diversos organismos, desde fungos, bactérias e algas até plantas e animais (Saini et al. 2020; Poria et al. 2021). São classificadas de acordo com seu modo de ação e padrão de hidrólise da estrutura da quitina. Endoquitinases (E.C 3.2.1.14) quebram aleatoriamente as ligações β -1,4 da quitina, liberando N-acetilglicosamina e outros oligômeros como quitobiose, quitotriose e quitoooligosacarídeos (QOS) (Ornela and Guimarães 2024). Já as exoquitinases, são subdivididas em dois grupos, exoquitinases (EC 3.2.1.200), que hidrolisam a porção não redutora das cadeias de quitina e quitodextrina e as wxoquitinases (EC 3.2.1.201), que catabolizam a hidrólise da N-acetiquitobiose da porção redutora da cadeia polimérica da quitina e quitodextrina (Rajput et al. 2022).

Inicialmente, quitinases foram estudadas por conta de seu papel no processo de reciclagem da biomatéria, entretanto, logo começaram a chamar atenção por sua multifuncionalidade em diferentes sistemas biológicos, ultrapassando os limites da hidrólise da quitina (Unuofin et al. 2024). Quitinases podem ser empregadas no setor

agrícola, atuando no biocontrole de fungos e insetos (Poria et al. 2021), na produção de proteínas unicelulares (Thakur et al. 2023), na produção de quitooligosacarídeos (Helfenstein Rother et al. 2024a), no branqueamento nas indústrias de papel (Farkas et al. 2020), no biopolimento de tecidos na indústria têxtil (Rath et al. 2023) e nas áreas biomédicas e farmacêuticas, principalmente na cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e terapias antifúngicas (Unuofin et al. 2024).

Além disso, são empregadas na biorremediação de ambientes contaminados pela má disposição de resíduos sólidos pesqueiros, como casca de camarão, caranguejo e cabeça e escamas de peixes que apresentam em sua estrutura grandes quantidades de quitina (Khajavian et al. 2022). O mercado mundial de pescados é estimado em 67,6 bilhões de dólares até o final de 2025 (Nirmal et al. 2020), sendo a criação de crustáceos um dos setores de maior importância econômica. Estima-se que sejam produzidos de 6 a 8 milhões de toneladas de resíduos pesqueiros todos os anos (Mao et al. 2017), dos quais, apenas a Ásia é responsável por 80% (Nirmal et al. 2020).

Escamas de peixes e cascas de crustáceos são importantes fontes renováveis de quitina (20-60%) que podem ser convertidas em quitosana e outros quitooligômeros (Nurfatihayati et al. 2022) biocompatíveis e biodegradáveis, de grande valor comercial (Widyastuti et al. 2022). Entretanto, os métodos padronizados de conversão química da quitina em quitooligosacarídeos são dispendiosos e geram grandes quantidades de ácidos (HCl) e bases (NaOH) residuais, necessários para a desmineralização e desproteinização desses resíduos (Widyastuti et al. 2022). Adicionalmente, o uso de produtos químicos corrosivos em altas temperaturas (>100 °C) por diferentes períodos (0 – 15 h) afeta diretamente a viscosidade, o peso molecular e o grau de acetilação dos produtos finais da conversão de quitina em quitosana (Jia and Shen 2002; Vicente et al. 2021).

Deste modo, processos biológicos envolvidos na bioconversão da quitina mediados por enzimas, são consideradas alternativas sustentáveis e econômicas para o gerenciamento e biorremediação de ambientes contaminados pelo excesso de resíduos pesqueiros (Mohan et al. 2022; Widyastuti et al. 2022). Ainda assim, estes recursos apresentam baixa adesão industrial por conta dos altos custos para regularização e obtenção de enzimas purificadas (Vicente et al. 2021). Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção extracelular de uma quitinase produzida pelo fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM e a aplicação do filtrado

bruto enzimático na degradação de escamas de tilápia e casca de camarão *in natura* (sem pré-tratamento químico ou físico) como alternativa para hidrólise de resíduos de quitina, gerando produtos de valor agregado com eficiência e baixo custo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais utilizados

A quitina coloidal (Fu et al. 2016) foi obtida a partir do pó de quitina de grau prático (Sigma-Aldrich-Merck®). A glicose, quitosana e o substrato N-acetil-β-D-glicosaminídeo (pNP-GlcNAc) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich-Merck®. As cascas de tomate-caqui e laranja-pera foram obtidas em mercado local.

2.2 Microrganismo e manutenção da linhagem

O fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM foi isolado de uma amostra de solo de uma plantação de soja, próxima a um fragmento de Mata Atlântica, no município de Nova Aurora/PR (Rasbold et al. 2021). A manutenção da linhagem foi realizada em tubos de ensaio estéreis, contendo meio BDA (Batata dextrose ágar, incubados em estufa bacteriológica a 28°C por 7 dias, depois conservado em geladeira.

2.3 Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir das culturas em BDA. Adicionou-se 5mL de água deionizada estéril em cada tubo de ensaio para ressuspensão dos esporos com auxílio de alça plástica estéril. A suspensão de esporos foi diluída com água até a obtenção da concentração de 2×10^5 esporos mL⁻¹.

2.4 Condições de cultivo

O fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM foi cultivado em meio Czapeck líquido, suplementado diferentes fontes de carbono a 1% (p/v). O cultivo foi conduzido em frascos erlenmeyers de 150 mL de capacidade contendo 25 mL de meio em cada frasco. A cada cultivo foi adicionado 1,5mL da solução de esporos e incubados a 28 °C por sete dias em condições estacionárias. Diferentes fontes de carbono foram empregadas em concentrações que variaram de 0.5 a 1% (p/v) nos experimentos.

As fontes de carbono utilizadas foram: Pupa macerada 1% (1), Quitosana 1% (2), Casca de camarão 1% (3), Casca de camarão 1%+ glicose 0,5% (4), Glicose 1%

(5), Quitina coloidal 1% (6), Quitina coloidal 0,5% + Glicose 0,5% (7), Casca de tomate 1% (8), Casca de tomate 0,5% + Farinha de linhaça 0,5% (9), Farinha de linhaça 1% (10), Casca de laranja 1% (11), Pupa inteira 1% (12), Escama de tilápia 1% (13) e Cabeça de camarão sete barba 1% (14).

As cascas de tomate-caqui e laranja-pera foram obtidas a partir dos legumes e frutos frescos os quais foram imersos em solução de hipoclorito 1% (v/v) por 1 minuto para limpeza e banhados em água corrente, posteriormente foram secos a temperatura ambiente. Os legumes e frutas foram descascadas e as cascas foram desidratadas em estufa ventilada a 50 °C por 5 dias até que estivessem em ponto de quebra. Com auxílio de cadinho e pistilo, as cascas foram maceradas até se tornarem pó, peneiradas e armazenadas em frascos a temperatura ambiente até o momento do uso.

Escamas do peixe tilápia (*Oreochromis aureus*) e casca de camarão (*Farfantepenaeus sp.*) também foram usadas como fonte de carbono e indutoras da atividade quitinase bem como em ensaios posteriores de microscopias eletrônicas de varredura (MEV). As escamas de tilápia e cascas de camarão, na proporção de 10 g para 100 mL de solução de lavagem, foram previamente e separadamente tratadas com três lavagens subsequentes de 10 minutos cada uma em solução de hipoclorito comercial; solução de hipoclorito a 1% e solução de hipoclorito a 0,1%. Em seguida foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e secas em estufa a 50 °C por 2 horas e posteriormente armazenados em frascos a temperatura ambiente.

Após crescimento em diferentes tempos de cultivo, as culturas fúngicas foram filtradas em bomba de vácuo com uso de funil de buchner em papel whatman número 1. O filtrado foi denominado extrato enzimático bruto livre de micélio, e este, foi armazenado em freezer a -20 °C para determinação de atividades proteicas e enzimáticas.

2.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade de quitinase foi determinada incubando-se a mistura de reação contendo 50 µL do extrato enzimático bruto, 50 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-D-glicosaminídeo a 0,25 mg mL⁻¹ (Sigma Aldrich®) diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 4,5 e incubados a 40 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida com 200 µL de tampão Na₂CO₃ 0,4 M e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 405nm. Uma unidade de atividade de quitinase (U) foi definida

como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-nitrofenol por minuto de reação.

A determinação das proteínas extracelulares do extrato enzimático bruto foi realizada pela metodologia de Bradford (1976), utilizando Soroalbumina bovina (BSA) como padrão e os resultados apresentados em mg de proteína por mL de extrato enzimático.

2.6 SDS-PAGE e zimograma

Para análise do perfil proteico presente na amostra, foi realizada a eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, de acordo com descrito por Laemmli (1970), utilizando 6% gel de acrilamida de empilhamento e 10% gel de resolução.

O extrato enzimático bruto foi filtrado e dialisado em membrana de corte molecular de 30 kDa e centrifugado a 10 g por 8 minutos. O concentrado proteico presente na membrana foi ressuspensão em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e liofilizado.

A corrida eletroforética foi realizada a 120 V e 20 mA a temperatura ambiente. Foi utilizado o marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained da Thermo Scientific® (10-250 kDa) como referência. Para visualização das proteínas após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

O zimograma foi realizado de acordo com a metodologia de Tronsmo e Harman (1993), utilizando 4-MUF-NAG como substrato.

2.7 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática da quitinase extracelular

A determinação do pH ótimo para quitinase foi determinado incubando-se a enzima com 0,25 mg mL⁻¹ substrato dissolvido em diferentes tampões de acordo com a faixa de pH testada, sendo Mc Ilvaine 0,1M pH 3-4, acetato de sódio 0,1 M pH 4,5-5,5, fosfato de sódio 0,1 M pH 6 e borato de sódio 0,1M pH 6,5-9 em temperatura constante de 40 °C. A estabilidade ao pH foi determinada pela atividade residual da enzima após incubação no tampão considerado ótimo para atividade da enzima, a 4 °C por 72 horas.

Para determinação da temperatura ótima, as análises da atividade foram conduzidas no pH ótimo previamente definido em diferentes temperaturas partindo de

25 °C a 70 °C. A estabilidade térmica foi definida pela atividade residual após incubação da enzima, sem substrato, a 50, 55, 60 e 65 °C por até 240 minutos.

2.8 Concentração do substrato

A concentração ideal de substrato foi determinada a partir da atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato variando entre 0,1mg mL⁻¹ a 1,1 mg mL⁻¹ nas condições ótimas de pH e temperatura aparentes determinadas.

2.9 Hidrólise enzimática da casca de camarão e escama de tilápia e análise morfológica

Para análise da degradação dos resíduos orgânicos por ação enzimática, foram usadas amostras de escamas do peixe tilápia (*Oreochromis aureus*) e casca de camarão (*Farfantepenaeus sp.*). As escamas de tilápia e cascas de camarão, foram preparadas como descrito no item 2.3 da seção Materiais e Métodos. Posteriormente, cerca de 0,1 g de casca de camarão ou escama de tilápia foram incubadas separadamente por 24 e 48 horas com 40 °C em banho seco sob agitação constante de 150 rpm, com extrato bruto enzimático obtido do filtrado do cultivo de *C. echinulata* contendo 1.8 U mL⁻¹ de quitinase diluída em tampão acetato de sódio 0,1 M (v/v), pH 4,5.

2.10 Análise morfológica por MEV após hidrólise enzimática da casca do camarão e escama de tilápia

O efeito da ação enzimática sobre as amostras ricas em quitina foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras submetidas à análise foram colocadas em placa de alumínio, aderidas à superfície por fita de carbono dupla face, cobertas com 20 nm de ouro em evaporador (Denton Vacuum Desk V) e posteriormente analisadas em aparelho Tescan Vega 3, 40 XVP operado a 15 kV. Para controle, foram utilizadas amostras de escama de tilápia e casca de camarão tratadas da mesma forma, entretanto o extrato enzimático rico em quitinase foi substituído pelo extrato enzimático obtido do fungo no tempo zero, de crescimento, ou seja, sem atividade de quitinase. Todas as amostras foram lavadas três vezes por 10 minutos com água destilada estéril e incubadas por 2 horas em estufa a 50 °C para secagem. Os resultados da ação enzimática foram expressos de forma qualitativa a partir do registro das imagens de fotomicrografias obtidas nos diferentes tratamentos com

aumento de 10.000 vezes. Todas as imagens foram geradas em microscópio eletrônico de varredura Tescan Vega3 na Universidade Federal do Paraná, *campus* Palotina.

2.11 Análise dos produtos da hidrólise enzimática da casca de camarão *in natura*

A reação de hidrólise foi realizada com 10U da enzima presente no extrato enzimático bruto foram incubadas com quitina a casca de camarão *in natura* 1% em tampão acetato de sódio (0,5 M pH 4,5) a 55 °C a 200 rpm. As alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, fervidas a 100 °C por 5 minutos e armazenadas a -20 °C até serem utilizadas.

Para análise dos produtos da hidrólise da casca de camarão, o método de cromatografia de camada delgada (CCD) foi empregado para identificação do tamanho dos quitoooligosacarídeos de forma visual e com custos mais acessíveis, quando comparados com a HPLC. A fase móvel foi composta por n-butanol: etanol: água (5:3:2 v/v/v), posteriormente revelada com solução de difenilamina-anilina-ácido fosfórico. A placa de sílica foi revelada em estufa a 120 °C por aproximadamente 50 min. (DPA) (ANDERSON; LI; LI, 2000)

3. Resultados e discussão

3.1 Influência da fonte de carbono na produção enzimática

A melhor fonte de carbono indutora para produção enzimática extracelular de quitinase pelo fungo *C. echinulata* PA3S12MM foi obtida com suplementação de escama de tilápia 1% (5,20 U mL⁻¹), seguida de glicose 1% (3,62 U mL⁻¹). As outras fontes de carbono testadas apresentaram atividade quitinolítica menor que 3 U mL⁻¹ (Figura 1).

Neste trabalho, escamas de tilápia foram a melhor fonte indutora para produção de quitinases extracelulares, o que pode ser justificado pela sua formação estrutural. As escamas de peixes, sejam de ambiente marinho ou de água doce, são formadas predominantemente por uma matriz inorgânica (50,3%) e uma matriz orgânica (49,7%), sendo a matriz orgânica composta principalmente de colágeno tipo I e quitina (KUMARI; RATH, 2014; SANTOS et al., 2009). Adicionalmente, análises feitas por Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) indicam a presença de carbono, nitrogênio, oxigênio, magnésio, fósforo e cálcio como elementos preponderantes da matriz orgânica (SANTOS et al., 2009).

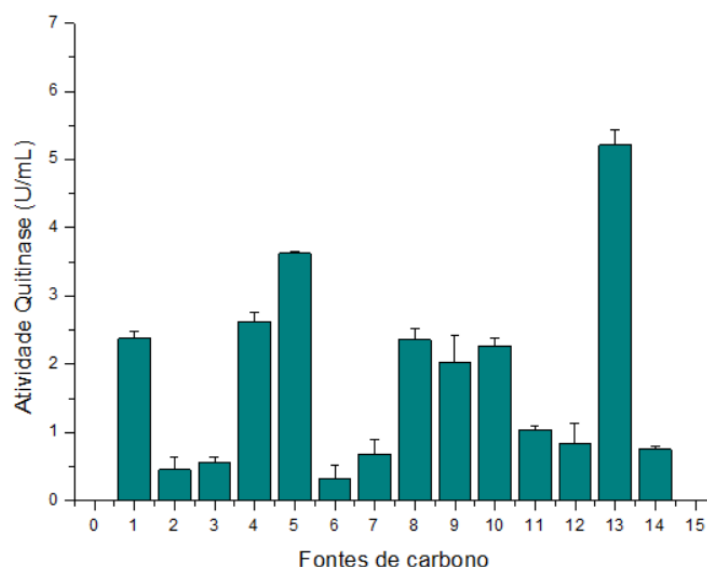


Figura 3 Influência da fonte de carbono na produção enzimática extracelular de quitinase no fungo *C. echinulata* PA3S12MM. Os cultivos líquidos foram suplementados com 1% (p/v) de cada fonte de carbono e incubados por 7 dias a 28 °C de forma estacionária. As fontes de carbono são: pupa macerada 1% (1), quitosana 1% (2), casca de camarão 1% (3), casca de camarão 1%+ glicose 0,5% (4), glicose 1% (5), quitina coloidal 1% (6), quitina coloidal 0,5% + glicose 0,5% (7), casca de tomate 1% (8), casca de tomate 0,5% + farinha de linhaça 0,5% (9), farinha de linhaça 1% (10), casca de laranja 1% (11), pupa inteira 1% (12), escama de tilápia 1% (13) e cabeça de camarão sete barba 1% (14).

Donzelli e Harman (2001) sugerem que a expressão e produção de quitinase só podem ser induzidas por quitina, porém *C. echinulata* PA3S12MM apresentou atividade de 3,62 U mL⁻¹ quando suplementada apenas com glicose. Este resultado vai de encontro ao relatado por KROLICKA et al., (2018), onde o fungo *Myceliophthora thermophila* apresentou uma atividade quitinolítica de 3,5 U mL⁻¹ suplementado apenas com glicose.

Neste trabalho pode-se notar que todas as fontes de carbono que tiveram glicose adicionada apresentaram maior expressão enzimática, diferindo dos resultados verificados anteriormente, onde a produção enzimática de quitinase, na presença de glicose diminuiu consideravelmente em *Alternaria alternata* Sharaf (2005), ou foi completamente inibida em *Trichoderma atroviride* (Donzelli and Harman 2001).

Por apresentarem diferentes funções em diferentes microrganismos, a produção de quitinase não apresenta características unificadas, porém sua produção a partir de resíduos que apresentam quitina em sua composição é bem consolidada.

A quitina coloidal estimulou a produção enzimática em fungos como verificado em *Eremothecium ashbyii* (6,2 U mL⁻¹) (Simadri et al. 2020), *Trichoderma harzianum* TUBF 966 (14,7 U mL⁻¹) (Sandhya et al. 2004), *Trichoderma longibrachiatum* (5,64 U mL⁻¹) (Anwar et al. 2023), *Alternaria alternata* (5,48 U mL⁻¹) (Sharaf 2005), *Trichoderma virens* (0,14 U mL⁻¹) (Wasli et al. 2009), e em *Cunninghamella echinulata* (0,32 U mL⁻¹) (presente estudo).

No estudo de Ornela e Guimarães (2024), *Aspergillus niveus*, suplementado com casca de camarão como fonte de carbono, apresentou atividade quitinolítica extracelular de 0,14 U mL⁻¹ com 96 horas de cultivo. Paralelamente, *C. echinulata* PA3S12MM apresenta atividade de 0,56 U mL⁻¹ quando cultivada com a mesma fonte de carbono por 7 dias e 2,62 U mL⁻¹ no mesmo período quando acrescida de glicose.

Escamas de tilápia são ricas em quitina e podem ser usadas como substrato para crescimento fúngico e fonte indutora da produção enzimática de quitinases (Kumari and Rath 2014). O melhor resultado de expressão enzimática em *C. echinulata* PA3S12MM nas condições iniciais de cultivo foi de 5,20 U mL⁻¹ na presença de escamas de tilápia. *Citrobacter freundii* (Meruvu and Meruvu 2019) e *Aspergillus terreus* (Ghanem et al. 2010) também apresentaram melhor desenvolvimento enzimático na presença de escamas de peixes.

Outro fator importante considerado na produção enzimática a partir deste resíduo é em relação ao tamanho da escama. Ghanem et al., (2010) comprovaram, após otimização por análise estatística, que a atividade da quitinase é maior em substratos com as escamas inteiras e que é possível notar uma considerável queda na produção enzimática quando se utiliza escamas moídas ou em forma de farelo.

3.2 Influência do tempo de cultivo na produção enzimática

A produção enzimática por *C. echinulata* PA3S12MM foi paralela ao tempo de cultivo, aumentando gradualmente durante o período de incubação até o décimo dia em meio suplementado com escama de tilápia a 1% (p/v) como fonte de carbono (13,09 U mL⁻¹) (Figura 2) a 28 °C em condições estacionárias. Após o décimo dia, uma queda brusca de 49% na atividade enzimática foi verificada no décimo segundo dia de cultivo fúngico.

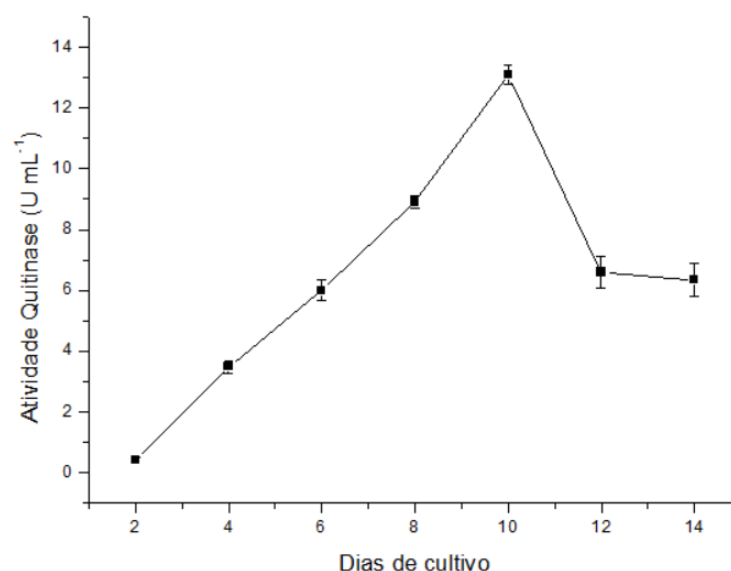


Figura 4 Influência do tempo de cultivo para a produção da enzima quitinase em *C. echinulata* PA3S12MM em cultivo submerso a 28°C, contendo escama de tilápia como fonte de carbono sob condições estacionárias.

Resultados similares foram encontrados para atividade de quitinase por Pommer et al., (2021) no cultivo de *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T suplementado com casca de laranja, onde a maior produção enzimática também aconteceu no 10º dia de crescimento com queda de atividade nos dois dias subsequentes. Fungos filamentosos apresentam diferentes tempos de incubação para produção de quitinase, onde a incubação prolongada pode ser desvantajosa para produção enzimática, como em *A. alternata* que após 7 dias de cultivo apresentou queda severa na produção enzimática (Sharaf 2005).

A produção enzimática também depende diretamente da suplementação, disponibilidade de substrato, das condições de cultivo e da espécie fúngica, variando de acordo com as adaptações de cada microrganismo, podendo apresentar atividade máxima a partir de 6 dias de cultivo, como em *A. niveus* (Ornela and Guimarães 2022), 4 dias para *Trichoderma longibrachiatum* (Anwar et al. 2023) e 3 dias para *Penicillium aculeatum* (Binod et al. 2005).

3.3 Influência da temperatura e do pH na atividade da quitinase do extrato bruto

A temperatura e pH ótimos aparentes da quitinase da *C. echinulata* PA3S12MM presente no extrato bruto filtrado livre de micélio, estão apresentados na figura 3. Como observado, a máxima atividade enzimática foi obtida em temperatura de 55 °C e variando muito pouco a 60 °C (figura 3 a) e pH de 4,5 (figura 3 b) em tampão fosfato

de sódio 50 mM. A composição do tampão influenciou na atividade enzimática, apresentando um aumento de 220% na atividade (figura 3 c) com o tampão acetato de sódio 50 mM.

Quando as condições ótimas foram associadas, verificou-se que *C. echinulata* PA3S12MM apresentou uma atividade enzimática de 22,76 U mL⁻¹ após 10 minutos de incubação com o substrato. Este achado agrupa a quitinase de *C. echinulata* PA3S12MM entre uma das mais de dezenas quitinases promissoras de outras origens fúngicas estudadas até o momento, porque mesmo sem etapas elaboradas e dispendiosas de purificação enzimática, o extrato bruto enriquecido com quitinase no presente trabalho, mostra certa solidez para aplicações biotecnológicas relacionadas a biorremediação de resíduos orgânicos ricos em quitina, como será abordado mais à frente.

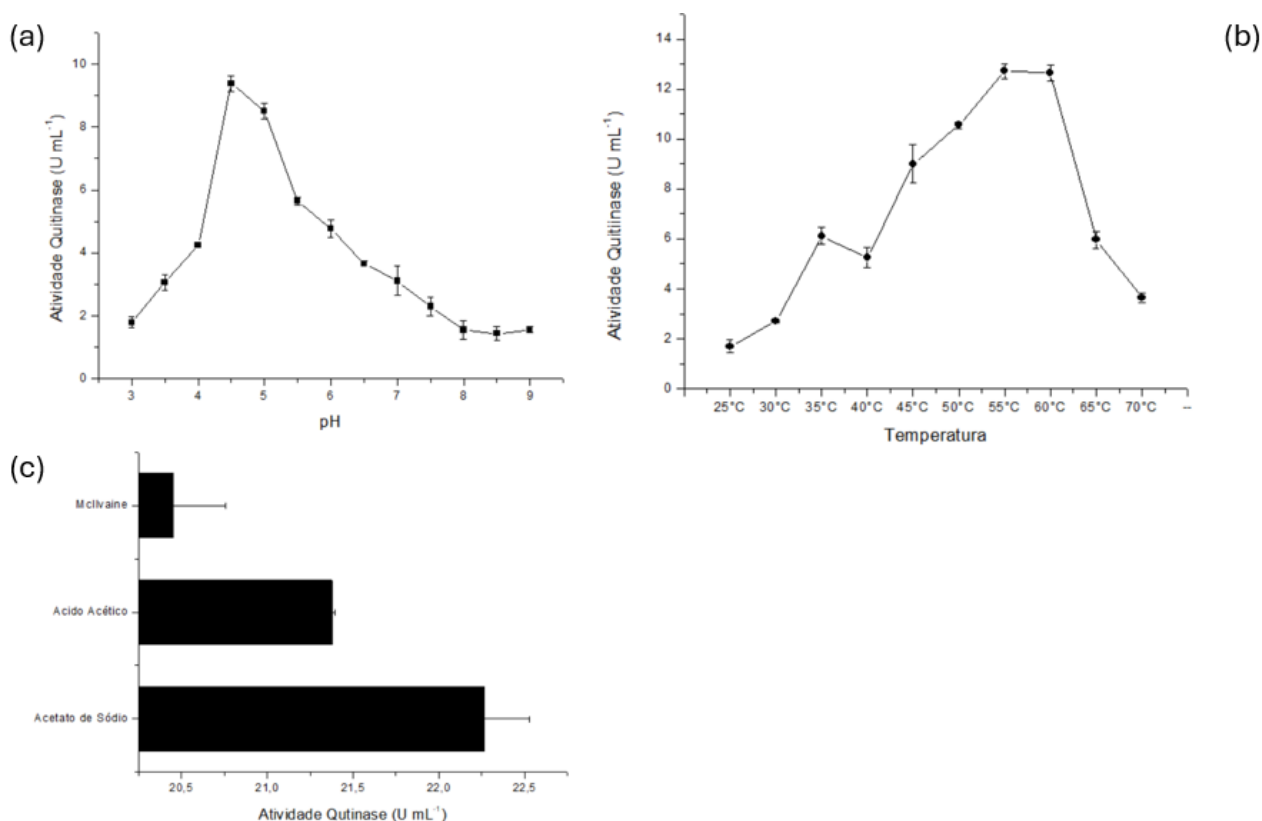


Figura 5 Influência do pH (a), temperatura (b) e tampão na concentração de 50 mM (c) na atividade enzimática de quitinase de *C. echinulata* PA3S12MM presente no extrato bruto filtrado, cultivada em meio líquido a 28 °C por 10 dias suplementada com escama de tilápia como fonte de carbono.

Analisando a influência da temperatura na atividade enzimática, nota-se que para *Penicillium janthinellum* CHI1 (Di Giambattista et al. 2001) e *Myceliophthora*

thermophila (Krolicka et al. 2018) a temperatura ótima enzimática também foi de 55 °C. Além disso, *C. echinulata* PA3S12MM apresenta grande similaridade com outros fungos como *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T (Pommer et al. 2021), *Aspergillus terreus* (Farag et al. 2016), *Trichoderma viride* AUMC 13021 (Abu-Tahon and Isaac 2020) e *Penicillium chrysogenum* MH745129 (Atalla et al. 2020) com melhor atividade enzimática em 50, 50, 40 e 40 °C respectivamente. As variações na temperatura impactam diretamente na taxa de reação, desnaturação ou inativação enzimática. Como esta propriedade é relativa a cada enzima, diferentes espécies fúngicas apresentam diferentes faixas de temperatura ótima e estabilidade enzimática (Kabir and Ju 2023).

A ação enzimática em pH ácido é característico das quitinases (Abu-Tahon and Isaac 2020). Para os fungos *A. flavus* CFR 10 (Suresh and Anil Kumar 2012), *P. janthinellum* P9 CHI2 (Di Giambattista et al. 2001) e *T. harzianum* (Sandhya et al. 2004) a melhor faixa de pH para produção enzimática também foi de 4,5. Quitinases fúngicas apresentam, em sua maioria, pH ótimo entre 4 e 6, como é observado em quitinases de *Trichoderma virens* (Wasli et al. 2009), *Trichoderma asperellum* (Berini et al. 2024) e *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T (Helfenstein Rother et al. 2024b) com pHs de 4, 5 e 6, respectivamente.

Entretanto, existem algumas quitinases fúngicas que apresentam exceções a esses parâmetros. Estáveis em pH neutros e básicos, quitinases de *Aspergillus flavus* (AUMC 13576) (Beltagy et al. 2018) e *Thermoascus aurantiacus* (Krolicka et al. 2018) apresentam pH ótimo de 7,5 e 8, respectivamente. Esta diferença na sensibilidade enzimática aos diferentes valores de pH pode ser atribuída diretamente a protonação dos aminoácidos das cadeias laterais, que afetam a conformação tridimensional da enzima e sua funcionalidade e estabilidade (Kabir and Ju 2023).

3.4 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE e zimograma do extrato enzimático bruto

A massa molecular da quitinase analisada foi estimada em 70 kDa (Figura 4). A partir da análise do zimograma, é possível verificar a atividade quitinolítica na mesma altura da banda de SDS-PAGE, comprovando a presença da atividade enzimática da quitinase estudada.

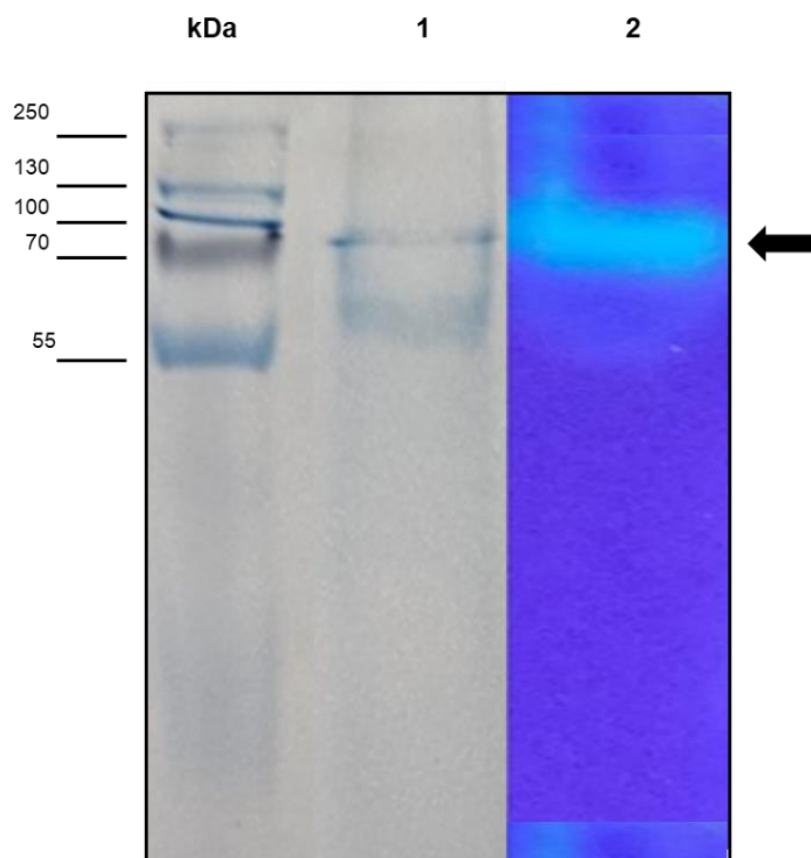


Figura 6 Análise por SDS-PAGE e zimograma da enzima quitinase de *C. echinulata* PA3S12MM. (kDa) Marcador de peso molecular, (1) extrato bruto de cultivo após ultrafiltração e corte molecular de 10kDa e (2) zimograma.

Quitinases fúngicas variam em seu tamanho e geralmente apresentam peso molecular entre 30 e 120 kDa (Tabela 1). Quitinases de *A. terreus* e *A. niger* LOCK 62 apresentam peso molecular de 60 e 73 kDa respectivamente, apresentando similaridade ao peso molecular da quitinase descrita neste trabalho, porém, ambas foram suplementadas com casca de camarão como fonte indutora, apresentando várias bandas proteicas na análise por SDS-PAGE do extrato bruto (BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012; FARAG et al., 2016).

Como apresentado na figura 6, é possível a identificação de apenas duas bandas proteicas no extrato bruto enzimático de *C. echinulata* PA3S12MM, o que pode ser atribuído a diversos fatores, um deles sendo a fonte de carbono utilizada. Estudos realizados com casca de camarão sete-barba e camarão rosa mostram que a diferença na composição da casca do camarão relacionada à espécie, a estação e ao local de onde o animal foi retirado refletem nas propriedades do meio de cultivo, e por consequência, afetam o desenvolvimento e produção enzimática do fungo (ORNELA; GUIMARÃES, 2024). Da mesma forma, a composição da escama da tilápia

(*Oreochromis aureus*) utilizada neste trabalho pode ter refletido na produção enzimática de quitinase em *C. echinulata* PA3S12MM.

O perfil proteico pode variar também de acordo com a fase de crescimento do microrganismo, apresentando maior diversidade proteica em estágios iniciais, como no caso de *P. aculeatum* NRLL 2129 e *A. niveus* que apresentam maior atividade quitinolítica com apenas 3 e 4 dias, respectivamente (BINOD et al., 2005; ORNELA; GUIMARÃES, 2024). Enquanto em fases tardias, como neste estudo, onde a maior produção enzimática de quitinase foi obtida com 10 dias de cultivo, outras proteínas dominam.

3.5 Degradação enzimática de escama de tilápia e casca de camarão com a quitinase extracelular

A escama de tilápia e casca de camarão foram tratadas com quitinase extracelular de *C. echinulata* PA3S12MM. A ação da atividade quitinolítica foi avaliada por MEV e as imagens obtidas em aumento de 10.000 X após 24 horas de tratamento com 1,8 U enzimática mostraram uma alteração estrutural apresentada por ranhuras superficiais (Figura 4 b, d) comparado ao controle (amostras sem a adição de enzima) (Figura 4 a, c). Este resultado sugere que a quitinase de *C. echinulata* pode ter um papel funcional efetivo na biodegradação de resíduos *in natura* derivados da indústria pesqueira, sem a necessidade de tratamento prévio com ácidos ou bases.

Dados similares foram descritos por Rother et al (2024), os quais empregaram uma quitinase parcialmente purificada de *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T, para a biodegradação da casca de camarão, por um período de 24 horas.

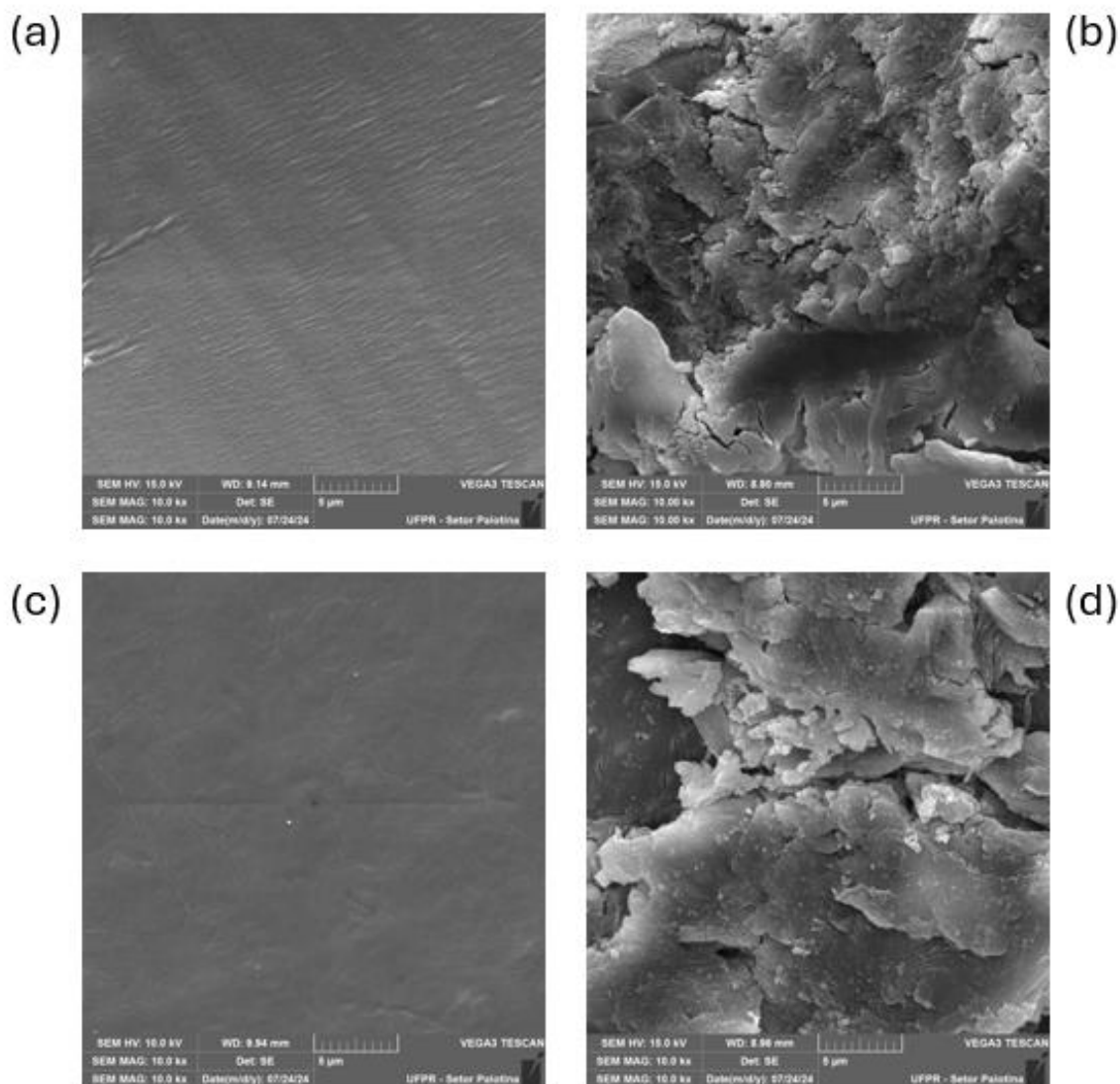


Figura 7 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da escama de tilápia e casca de camarão *in natura* tratadas com quitinases de *C. echinulata* presentes no extrato bruto (b) e (d) respectivamente. Controle: amostras de escama de tilápia e casca de camarão incubadas em tampão por 24 horas (a) e (c), respectivamente. As amostras foram analisadas em aumento de 10.0 kx e resolução de 15 kV.

Como indicado anteriormente, as imagens de MEV mostram que a quebra dos resíduos quitinolíticos na escama de tilápia e casca de camarão por quitinases presentes no extrato bruto extracelular de *C. echinulata* PA3S12MM podem ocorrer de maneira eficiente e barata, uma vez que dispensa etapas onerosas de purificação enzimática para uma aplicação biotecnológica sustentável. O emprego do extrato extracelular de *C. echinulata* PA3S12MM rico em quitinase dispensa o tratamento dos resíduos da indústria pesqueira por produtos ácidos e/ou básicos mais severos, os

quais representam uma fonte de contaminação ambiental, figurando assim uma alternativa promissora para o uso em processos sustentáveis de biodegradação.

3.6 Análise dos produtos da hidrólise enzimática da casca do camarão

A análise dos produtos da hidrólise da casca de camarão *in natura* por CCD (Figura 5), sugere que a enzima estudada apresenta atividade de endoquitinase por apresentar quitooligosacarídeos como produto da reação, evidenciando a presença de quitotriose (GlcNAc)₃.

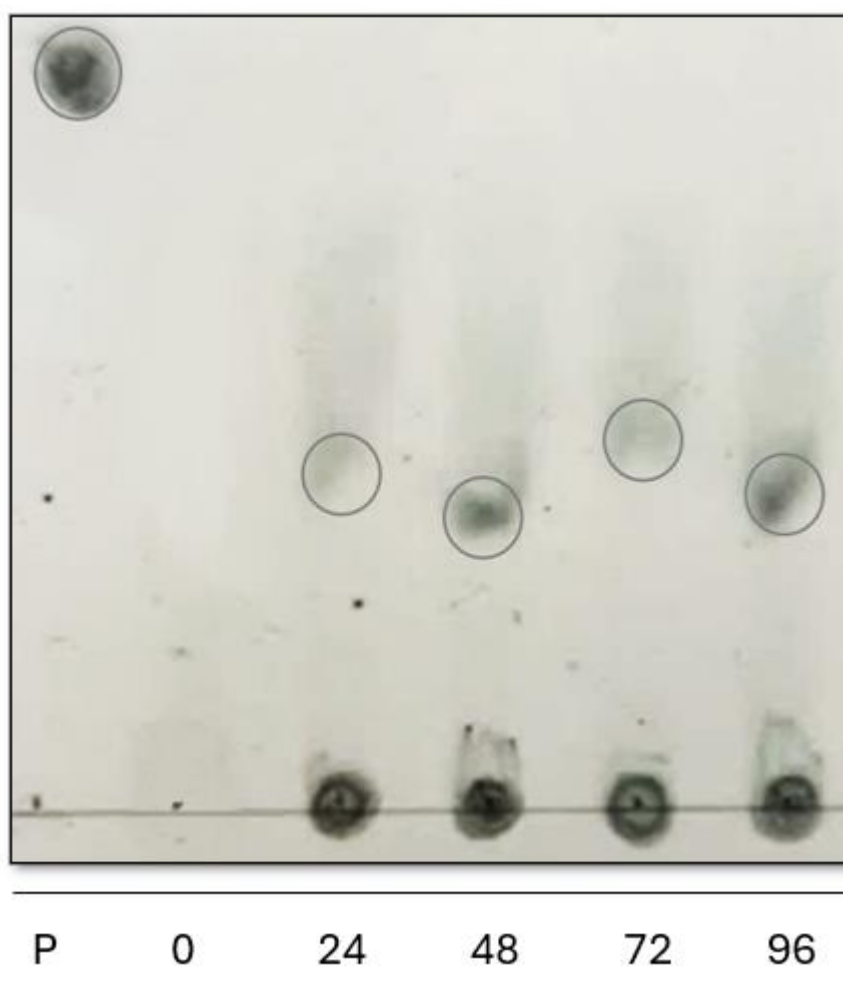


Figura 8 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos gerados a partir da hidrólise enzimática da casca de camarão *in natura* pela endoquitinase presente no extrato enzimático bruto após 24, 48, 72 e 96 horas. (P) padrão N-acetilglicosamina 1mg/mL.

Quando os produtos da hidrólise enzimática da quitina ou quitosana são classificados como quitotrioses (GlcNAc)₃, quitotetraose (GlcNAc)₄ e quitopentoses (GlcNAc)₅, estes são atribuídos exclusivamente a ação das endoquitinases, que quebram aleatoriamente as ligações da cadeia polimérica de quitina (XIA et al., 2001).

Alguns fungos podem produzir tanto endo quanto exoquitinases, capazes de atuar sinergicamente para a degradação da quitina em seu monômero de N-acetilglicosamina (GlcNAc). A produção de ambas enzimas pelo mesmo microrganismo foi relatada por Rother et al. (2024), Kumar et al., (2018) e Xie et al., 2021, evidenciando o potencial de *T. heterothallicus* PA2S4T, *Humicola grisea* e *Penicillium oxalicum* respectivamente, de hidrolisar a estrutura polimérica da quitina em Quitobiose (GlcNAc)₂ e N-acetilglicosamina (GlcNAc).

Quanto ao tempo de hidrólise da reação, fica evidente que a quitinase do extrato bruto de *C. echinulata* PA3S12MM foi capaz de converter a estrutura polimérica da quitina da casca do camarão *in natura* em apenas 24 horas, com aumento progressivo na quantidade de produto formado até 96 horas de reação. De forma similar, quitinases de *Penicillium. oxalicum* k10 apresentaram como produto da hidrólise da quitina coloidal, após 30 horas de incubação, a formação de quitobiose (GlcNAc)₂, quitotriose (GlcNAc)₃ e N-acetilglicosamina (GlcNAc) (XIE et al., 2021)

4 Conclusão

O fungo filamentoso *C. echinulata* PA3S12MM apresentou atividades quitinolíticas satisfatórias para aplicações biotecnológicas ambientais, usando um meio de cultivo simples e barato e um sistema de indução enzimática mediado pela presença do próprio resíduo pesqueiro, como as escamas de tilápia *in natura*. Os resultados obtidos na caracterização enzimática demonstram condições de pH e temperatura que podem proporcionar robustez ao emprego da enzima para escalonamento em nível industrial.

Além disso, as análises de MEV e CCD comprovaram que a quitinase presente no filtrado bruto é eficiente para alteração da estrutura quitinolítica da escama de tilápia e casca de camarão, oferecendo não só uma alternativa para o passivo ambiental oriundo do descarte irregular desses resíduos, mas também produzindo produtos de valor agregado ricos em proteínas para vários setores industriais de interesse biotecnológico, tais como o setor agrícola, farmacêutico, biomédico e alimentício.

Agradecimentos

P.M.R. C. foi bolsista da Capes.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

- Abu-Tahon MA, Isaac GS (2020) Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation. *J Gen Appl Microbiol* 66:32–40. <https://doi.org/10.2323/jgam.2019.04.006>
- Adnan M, Zafar M, Anwar Z (2024) Screening of Chitinolytic Microfungi and Optimization of Parameters for Hyperproduction of Chitinase Through Solid-State Fermentation Technique. *Appl Biochem Biotechnol* 196:1840–1862. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04663-y>
- Anderson K, Li SC, Li YT (2000) Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. *Anal Biochem* 287:337–339. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4829>
- Anwar W, Amin H, Khan HAA, et al (2023) Chitinase of *Trichoderma longibrachiatum* for control of *Aphis gossypii* in cotton plants. *Sci Rep* 13:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39965-y>
- Atalla SMM, EL Gamal NG, Awad HM (2020) Chitinase of marine *penicillium chrysogenum* MH745129: Isolation, identification, production and characterization as controller for citrus fruits postharvest pathogens. *Jordan J Biol Sci* 13:19–28
- Beltagy EA, Rawway M, Abdul-Raouf UM, et al (2018) Purification and characterization of thermohalophilic chitinase producing by halophilic *Aspergillus flavus* isolated from Suez Gulf. Egypt *J Aquat Res* 44:227–232. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.08.002>
- Berini F, Montali A, Liguori R, et al (2024) Production and characterization of *Trichoderma asperellum* chitinases and their use in synergy with *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran control. *Pest Manag Sci* 3401–3411. <https://doi.org/10.1002/ps.8045>
- Binod P, Pusztahelyi T, Nagy V, et al (2005) Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol* 36:880–887. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.031>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brzezinska MS, Jankiewicz U (2012) Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Curr Microbiol* 65:666–672. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0208-2>
- Di Giambattista R, Federici F, Petruccioli M, Fenice M (2001) The chitinolytic activity of *Penicillium janthinellum* P9: Purification, partial characterization and potential applications. *J Appl Microbiol* 91:498–505. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01409.x>
- Donzelli BGG, Harman GE (2001) Interaction of Ammonium, Glucose, and Chitin Regulates the Expression of Cell Wall-Degrading Enzymes in *Trichoderma atroviride* Strain P1. *Appl Environ Microbiol* 67:5643–5647. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5643-5647.2001>
- Farag AM, Abd-Elnabey HM, Ibrahim HAH, El-Shenawy M (2016) Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. *Egypt J Aquat Res* 42:185–192. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.04.004>
- Farkas C, Rezessy-Szabó JM, Gupta VK, et al (2020) Application of chitosan-based particles for deinking of printed paper and its bioethanol fermentation. *Fuel* 280:118570. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118570>
- Fu D, Xiang H, Yu C, et al (2016) Colloidal chitin reduces disease incidence of wounded pear fruit inoculated by *Penicillium expansum*. *Postharvest Biol Technol* 111:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.025>
- Ghanem KM, Al-Garni SM, Al-Makishah NH (2010) Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. *African J Biotechnol* 9:5135–5146
- Helfenstein Rother PD, Pommer V, Zuppa ÉS, et al (2024) Shrimp Shell Bioconversion and Prebiotic Production by Chitinases from *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T. *Waste and Biomass Valorization* 15:1019–1030. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02214-4>
- Jia Z, Shen D (2002) Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydr Polym* 49:393–396. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00026-7)
- Kabir MF, Ju LK (2023) On optimization of enzymatic processes: Temperature effects

- on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochem* 130:734–746.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031>
- Khajavian M, Vatanpour V, Castro-Muñoz R, Boczkaj G (2022) Chitin and derivative chitosan-based structures — Preparation strategies aided by deep eutectic solvents: A review. *Carbohydr Polym* 275:..
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118702>
- Krolicka M, Hinz SWA, Koetsier MJ, et al (2018) Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a Thermostable Enzyme for Chitin and Chitosan Depolymerization. *J Agric Food Chem* 66:1658–1669.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04032>
- Kumar M, Brar A, Vivekanand V, Pareek N (2018) Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea*. *Int J Biol Macromol* 116:931–938.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.125>
- Kumari S, Rath PK (2014) Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from (Labeo rohita) Fish Scales. *Procedia Mater Sci* 6:482–489.
<https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.062>
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat Publ Gr* 228:726–734
- Mao X, Guo N, Sun J, Xue C (2017) Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. *J Clean Prod* 143:814–823.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.042>
- Meruvu H, Meruvu HBT (2019) Anticoagulant activity of partially purified chitinase produced by *Citrobacter freundii* str. nov. haritD11 by fermentation of wheat bran coupled with fish scales. *SN Appl Sci* 1:1–9. <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0097-5>
- Mohan K, Ganesan AR, Ezhilarasi PN, et al (2022) Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review. *Carbohydr Polym* 287:119349.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119349>
- Nirmal NP, Santivarangkna C, Rajput MS, Benjakul S (2020) Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective. *Trends Food Sci Technol* 103:20–35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.001>
- Nurfatihayati, Azis Y, Mutamima A, et al (2022) Isotherms studies of equilibrium sorption of Cu²⁺ unto hydrochloric acid modified shrimp shell waste. *Mater Today*

- Proc 63:S496–S500. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.533>
- Ornela PH de OO, Guimarães LHS (2022) Utilization of shrimp fishing industry waste in the production of chitinases by the fungus *Aspergillus niveus* in solid-state fermentation. *Brazilian J Dev* 8:33846–33862. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n5-081>
- Ornela PH, Guimarães LHS (2024) Purification, Characterization and Antifungal Activity of the *Aspergillus niveus* Chitinase Produced Using Shrimp Shells. *Appl Biosci* 3:220–232. <https://doi.org/10.3390/applbiosci3020015>
- Pommer V, Helfenstein Rother PD, Rasbold LM, et al (2021) A novel *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T fungus isolated from the soil induces chitinase production using orange peel flour. *Sci Plena* 17:4–12. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.091501>
- Poria V, Rana A, Kumari A, et al (2021) Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. *Biology (Basel)* 10:1–20. <https://doi.org/10.3390/biology10121319>
- Rajput M, Kumar M, Pareek N (2022) Myco-chitinases as versatile biocatalysts for translation of coastal residual resources to eco-competent chito-bioactives. *Fungal Biol Rev* 41:52–69. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.04.001>
- Rasbold LM, Heinen PR, da Conceição Silva JL, et al (2021) *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM invertase: Biochemical characterization of a promiscuous enzyme. *J Food Biochem* 45:1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13654>
- Rath A, Grisin B, Pallicity TD, et al (2023) Fabrication of chitosan-flax composites with differing molecular weights and its effect on mechanical properties. *Compos Sci Technol* 235:109952. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2023.109952>
- Saini S, Chand M, Sharma HO, Kumar P (2020) Role of Chitinases as a waste management to control global crisis. *Int J Environ Rehabil Conserv* 303–313
- Sandhya C, Adapa LK, Nampoothiri KM, et al (2004) Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *J Basic Microbiol* 44:49–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310284>
- Santos EDB, Vieira EFDS, Cestari AR, Barreto LS (2009) Characterization of the piau fish (*Leporinus elongatus*) scales and their application to remove Cu(II) from aqueous solutions. *Quim Nova* 32:134–138. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100026>
- Sharaf EF (2005) A potent chitinolytic activity of *Alternaria alternata* isolated from

- Egyptian black sand. Polish J Microbiol 54:145–151
- Simadri D, Sandeep K, Vijayalakshmi S (2020) Production and partial characterization of chitinase and glucanase produced by riboflavin overproducer *Eremothecium Ashbyii*. Proc Int Conf Drug Discov 7:285–292
- Suresh P V., Anil Kumar PK (2012) Enhanced degradation of α -chitin materials prepared from shrimp processing byproduct and production of N-acetyl-d-glucosamine by thermoactive chitinases from soil mesophilic fungi. Biodegradation 23:597–607. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9536-y>
- Thakur D, Chauhan A, Jhila P, et al (2023) Microbial chitinases and their relevance in various industries. Folia Microbiol (Praha) 68:29–53. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00999-w>
- Tronsmo A, Harman GE (1993) Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. Anal. Biochem. 208:74–79
- Unuofin JO, Odeniyi OA, Majengbasan OS, et al (2024) Chitinases: expanding the boundaries of knowledge beyond routinized chitin degradation. Environ Sci Pollut Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33728-6>
- Vicente FA, Huš M, Likozar B, Novak U (2021) Chitin Deacetylation Using Deep Eutectic Solvents: Ab Initio-Supported Process Optimization. ACS Sustain Chem Eng 9:3874–3886. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c08976>
- Wasli AS, Salleh MM, Abd-Aziz S, et al (2009) Medium optimization for chitinase production from *Trichoderma virens* using central composite design. Biotechnol Bioprocess Eng 14:781–787. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0127-z>
- Widyastuti W, Setiawan F, Al Afandy C, et al (2022) Antifungal Agent Chitooligosaccharides Derived from Solid-State Fermentation of Shrimp Shell Waste by *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1. Fermentation 8:. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080353>
- Xia G, Jin C, Zhou J, et al (2001) A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. Eur J Biochem 268:4079–4085. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02323.x>
- Xie XH, Fu X, Yan XY, et al (2021) A broad-specificity chitinase from *penicillium oxalicum* k10 exhibits antifungal activity and biodegradation properties of chitin. Mar Drugs 19:. <https://doi.org/10.3390/md19070356>

3. CONCLUSÃO

O fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM mostrou resultados positivos na produção de quitinases extracelulares usando resíduos pesqueiros como fonte de carbono e apresentou características bioquímicas que favorecem sua aplicação biotecnológica. Além disso, quitinases presentes no filtrado bruto extracelular foram eficientes na degradação de materiais de quitina como casca de camarão e escama de tilápia *in natura* em apenas 24 horas sem a necessidade de pré-tratamento desses resíduos com hidrólise ácida ou básica. Os resultados mostram pela primeira vez que o fungo filamentoso *C. echinulata* PA3S12MM é capaz de produzir uma Endoquitinase extracelular capaz de degradar a estrutura da quitina e produzir quitooligosacarídeos sem a necessidade de processos dispendiosos de purificação enzimática.

4. REFERÊNCIAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- ABU-TAHON, M. A.; ISAAC, G. S. Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 32–40, 2020.
- ALCORN, G. D.; YEAGER, C. C. A Monograph of the Genus *Cunninghamella* with Additional Descriptions of Several Common Species. **Mycologia**, v. 30, n. 6, p. 653–658, 1938.
- ALVES, A. L. S. DE M. et al. *Cunninghamella clavata* from Brazil: a New Record for the Western Hemisphere. **Mycologia**, v. 132, n. 1, p. 381–389, 2017.
- AMIRI, H. et al. Chitin and chitosan derived from crustacean waste valorization streams can support food systems and the UN Sustainable Development Goals. **Nature Food**, v. 3, n. 10, p. 822–828, 2022.
- ANWAR, W. et al. Chitinase of *Trichoderma longibrachiatum* for control of *Aphis gossypii* in cotton plants. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2023.
- ATALLA, S. M. M.; EL GAMAL, N. G.; AWAD, H. M. Chitinase of marine *penicillium chrysogenum* MH745129: Isolation, identification, production and characterization as controller for citrus fruits postharvest pathogens. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 19–28, 2020.
- BAI, L. et al. Nanochitin: Chemistry, Structure, Assembly, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 13, p. 11604–11674, 2022.
- BELTAGY, E. A. et al. Purification and characterization of thermohalophilic chitinase

producing by halophilic *Aspergillus flavus* isolated from Suez Gulf. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 3, p. 227–232, 2018.

BERINI, F. et al. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 818–838, 2018.

BERINI, F. et al. Production and characterization of *Trichoderma asperellum* chitinases and their use in synergy with *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran control. **Pest Management Science**, n. February, p. 3401–3411, 2024.

BHADRA, F. et al. Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. **3 Biotech**, v. 12, n. 4, p. 1–17, 2022.

BINOD, P. et al. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 7, p. 880–887, 2005.

BROWN, H. E.; ESHER, S. K.; ALSPAUGH, J. A. Chitin: A “hidden figure” in the fungal cell wall. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 425, p. 83–111, 2020.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 666–672, 2012.

CHEN, W. M.; CHEN, C. S.; JIANG, S. T. Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Rhizopus Oryzae*. **Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)**, v. 21, n. 3, p. 361–366, 2013.

CHEN, W.; YANG, Q. Development of Novel Pesticides Targeting Insect Chitinases: A Minireview and Perspective. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 16, p. 4559–4565, 2020.

DI GIAMBATTISTA, R. et al. The chitinolytic activity of *Penicillium janthinellum* P9: Purification, partial characterization and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 498–505, 2001.

DRAVID, P. et al. Isolation and characterization of endochitinase and exochitinase of *Setaria cervi*. **Parasitology International**, v. 64, n. 6, p. 579–586, 2015.

E.K., S.; M.K. NISHA; E. GAAYATHIRI DEVI. Chitinase Production By *Aspergillus Terreus* From Marine Wastes and Its Efficacy in Antifungal Activity. **International Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 9, p. 1399–1404, 2020.

EI-MORSY, E. SAYE. M. *Cunninghamella echinulata* a New Biosorbent of Metal Ions from

Polluted Water in Egypt. **Mycological Society of America**, v. 96, n. 6, p. 1183–1189, 2004.

FARAG, A. M. et al. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 2, p. 185–192, 2016.

GHANEM, K. M.; AL-GARNI, S. M.; AL-MAKISHAH, N. H. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 32, p. 5135–5146, 2010.

GHANEM, K. M.; AL-GARNI S, M.; AL-MAKISHAH N, H. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 32, p. 5135–5146, 2010.

GOUGHENOUR, K. D. et al. Diversification of Fungal Chitinases and Their Functional Differentiation in *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 4, p. 1339–1355, 2021.

HAMID, R. et al. Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2013.

HELFENSTEIN ROTHER, P. D. et al. Shrimp Shell Bioconversion and Prebiotic Production by Chitinases from *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, n. 2, p. 1019–1030, 2024.

HOU, J.; AYDEMIR, B. E.; DUMANLI, A. G. Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 379, n. 2206, 2021.

KAUR, H.; RAHI, D. K. Response surface methodology-based optimisation of chitin production and its antioxidant activity from *Aspergillus niger*. **Heliyon**, v. 10, n. 4, p. e25646, 2024.

KAYA, M. et al. On chemistry of γ -chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 177–186, 2017.

KOBAYASHI, H.; SAGAWA, T.; FUKUOKA, A. Catalytic conversion of chitin as a nitrogen-containing biomass. **Chemical Communications**, v. 59, n. 42, p. 6301–6313, 2023.

KUMAR, D. P. et al. Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 388–395, 2012.

LI, K. et al. Advances in preparation, analysis and biological activities of single

chitooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 139, p. 178–190, 2016.

LIAQAT, F.; ELTEM, R. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, n. November 2017, p. 243–259, 2018.

MADAN, K. et al. Chitinases: Therapeutic Scaffolds for Allergy and Inflammation. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 46–57, 2020.

MAHAJAN, G.; SHARMA, V.; GUPTA, R. Chitinase: a potent biocatalyst and its diverse applications. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 42, n. 2, p. 85–109, 2024.

MAO, X. et al. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 814–823, 2017.

MATHEW, G. M. et al. Sustainable and eco-friendly strategies for shrimp shell valorization. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115656, 2020.

MESSERLI, M. A. et al. Construction and composition of the squid pen from doryteuthis pealeii. **Biological Bulletin**, v. 237, n. 1, p. 1–15, 2019.

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α -chitin. **Journal of Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p. 167–181, 1978.

MOUSSIAN, B. **Chitin: Structure, chemistry and biology**. [s.l.] Springer Singapore, 2019. v. 1142

MRUDULA, S.; ANITHARAJ, R. Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 6, n. 2, p. 64–71, 2011.

NAMPOOTHIRI, K. M. et al. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1583–1590, 2004.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews**, v. 94, n. 6, p. 2101–2137, 2019.

NING YAN; XI CHEN. Sustainability: Don't waste seafood waste. **Nature**, v. 524, p. 155–157, 2015.

ORNELA, P. H.; GUIMARÃES, L. H. S. Purification, Characterization and Antifungal Activity of the *Aspergillus niveus* Chitinase Produced Using Shrimp Shells. **Applied Biosciences**, v. 3, n. 2, p. 220–232, 2024.

PAKIZEH, M.; MORADI, A.; GHASSEMI, T. Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. **European Polymer Journal**, v. 159, n. May, p. 110709,

2021.

PATEL, S.; GOYAL, A. Chitin and chitinase: Role in pathogenicity, allergenicity and health. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 331–338, 2017.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. **Chemosphere**, v. 128, p. 231–235, 2015.

POMMER, V. et al. A novel *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T fungus isolated from the soil induces chitinase production using orange peel flour. **Scientia Plena**, v. 17, n. 9, p. 4–12, 2021.

PORIA, V. et al. Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. **Biology**, v. 10, n. 12, p. 1–20, 2021.

RAJENDRAN, K. et al. Chitinase from *Streptomyces mutabilis* as an Effective Eco-friendly Biocontrol Agent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 196, n. 1, p. 18–31, 2024.

RASBOLD, L. M. et al. *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM invertase: Biochemical characterization of a promiscuous enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1–9, 2021.

RONCERO, C.; VÁZQUEZ DE ALDANA, C. R. Glucanases and chitinases. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 425, p. 131–166, 2020.

S PATIL, N. Single Cell Protein Production Using *Penicillium ochrochloron* Chitinase and Its Evaluation in Fish Meal Formulations. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. s1, n. 01, p. 4–7, 2014.

SAINI, S. et al. Role of Chitinases as a waste management to control global crisis. **Int. J. Environ. Rehabil. Conserv**, p. 303–313, 2020.

SANDHYA, C. et al. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 49–58, 2004.

SHAMSHINA, J. L.; BERTON, P.; ROGERS, R. D. Advances in Functional Chitin Materials: A Review. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 7, n. 7, p. 6444–6457, 2019.

SHARAF, E. F. A potent chitinolytic activity of *Alternaria alternata* isolated from Egyptian black sand. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 145–151, 2005.

SHARMA, S. et al. Biocontrol potential of chitinases produced by newly isolated *Chitinophaga* sp. S167. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 6, 2020.

SIMADRI, D.; SANDEEP, K.; VIJAYALAKSHMI, S. Production and partial characterization of chitinase and glucanase produced by riboflavin overproducer *Eremothecium Ashbyii*. **Proceedings of International Conference on Drug Discovery**, v. 7, n. 3, p. 285–292, 2020.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 30–38, 2015.

SURESH, P. V.; ANIL KUMAR, P. K. Enhanced degradation of α -chitin materials prepared from shrimp processing byproduct and production of N-acetyl-d-glucosamine by thermoactive chitinases from soil mesophilic fungi. **Biodegradation**, v. 23, n. 4, p. 597–607, 2012.

THADATHIL, N. et al. Statistical optimization of solid state fermentation conditions for the enhanced production of thermoactive chitinases by mesophilic soil fungi using response surface methodology and their application in the reclamation of shrimp processing by-products. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 671–681, 2014.

THAKUR, D. et al. Microbial chitinases and their relevance in various industries. **Folia Microbiologica**, v. 68, n. 1, p. 29–53, 2023.

UNUOFIN, J. O. et al. Chitinases: expanding the boundaries of knowledge beyond routinized chitin degradation. **Environmental Science and Pollution Research**, 2024.

VAGHELA, B. et al. Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 159, n. September 2021, p. 110055, 2022.

WASLI, A. S. et al. Medium optimization for chitinase production from *Trichoderma virens* using central composite design. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 781–787, 2009.

XIA, G. et al. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 14, p. 4079–4085, 2001.

XIE, X. H. et al. A broad-specificity chitinase from *penicillium oxalicum* k10 exhibits antifungal activity and biodegradation properties of chitin. **Marine Drugs**, v. 19, n. 7, 2021.

YEHIA, R. S. Highlighting the potential for crude oil bioremediation of locally isolated *Cunninghamella echinulata* and *Mucor circinelloides*. **Brazilian Journal of**

Microbiology, v. 54, n. 3, p. 1969–1981, 2023.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZAWADZKA, K. et al. Microbial detoxification of carvedilol, a B-adrenergic antagonist, by the filamentous fungus *Cunninghamella echinulata*. **Chemosphere**, v. 183, p. 18–26, 2017.

ZHONG, D. F. et al. Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species.

Acta Pharmacologica Sinica, v. 24, n. 5, p. 442- 447+479, 2003.